

PYRIDOPYRIDAZINE DERIVATIVE AND ITS USE**Publication Number:** 05-078356 (JP 5078356 A)**Published:** March 30, 1993**Inventors:**

- MASUYA HIRONAGA
- ARAMAKI YOSHIO
- KONDO KOICHI

Applicants

- TAKEDA CHEM IND LTD (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application Number: 03-312347 (JP 91312347)**Filed:** November 27, 1991**International Class (IPC Edition 5):**

- C07D-471/04
- C07D-471/04
- C07D-471/14
- G01N-033/532
- C07D-491/048

JAPIO Class:

- 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY--- Organic Compounds)
- 28.2 (SANITATION--- Medical)
- 46.2 (INSTRUMENTATION--- Testing)

Abstract:

PURPOSE: To provide a pyridopyridazine derivative which is a chemoluminescent substance useful for the analysis utilizing chemoluminescence.

CONSTITUTION: A compound of formula I (R(sub 1) is (substituted)hydrocarbon group or (substituted)heterocyclic group; R(sub 2) is OH, SH, amino or monosubstituted amino; when R(sub 3) is monosubstituted amino, R(sub 3) and R(sub 1) may together form a ring; R(sub 3) is H, (substituted),QH, (substituted)amino, (substituted)SH, halogen, heterocyclic group, NO(sub 2), CN, (esterified or amidated) carboxyl, azido, sulfo or organic sulfonyl; R(sub 3) is not H when R(sub 1) is aliphatic group; X is O or S) or its salt, e.g. 8-hydroxy-7-(p-methoxyphenyl) pyrido(3,4-d)pyridazine-1,4(2H,3H) dione. The compounds of formula are new except for those wherein R(sub 3) is H and R(sub 1) is (substituted)aralkyl or unsubstituted aryl. For example, a compound of formula II (R is lower alkyl) is made to react with hydrazine to obtain the corresponding compound of formula I wherein X is O. (From: *Patent Abstracts of Japan*, Section: C, Section No. 1090, Vol. 17, No. 406, Pg. 45, July 29, 1993)

JAPIO

© 2006 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.
Dialog® File Number 347 Accession Number 4086656

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 471/04	1 1 9	8415-4C		
	1 0 4 Z	8415-4C		
471/14	1 0 2	8415-4C		
G 0 1 N 33/532	B	8310-2J		
// C 0 7 D 491/048		7019-4C		

審査請求 未請求 請求項の数8(全 34 頁)

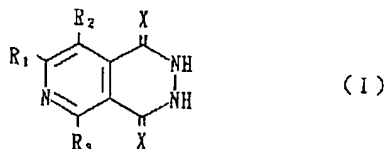
(21)出願番号	特願平3-312347	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成3年(1991)11月27日	(72)発明者	梶屋 浩大 兵庫県川辺郡猪名川町伏見台3丁目3番地の25
(31)優先権主張番号	特願平2-327777	(72)発明者	荒牧 慶夫 兵庫県伊丹市伊丹1丁目5番20-202号
(32)優先日	平2(1990)11月27日	(72)発明者	近藤 孝一 京都府相楽郡木津町兜台3丁目6番3号
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 ピリドピリダジン誘導体およびその用途

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 ピリドピリダジン誘導体またはその塩を用いる高感度測定法の提供。

【構成】 一般式(I)で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩、その製造法ならびにこれら化合物の化学発光を利用することを特徴とするアッセイ法。

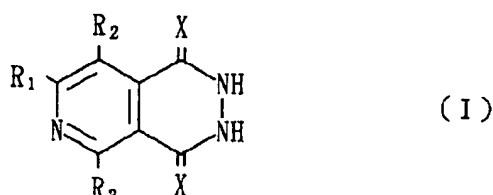


[式中、R₁は炭化水素基またはヘテロ環基を示し、R₂は水酸基、チオール基、アミノ基またはモノ置換アミノ基を示し、R₂がモノ置換アミノ基の場合、R₂はR₁と一緒に環を形成していてもよい。R₃は水素原子、それぞれ置換されていてもよい水酸基、アミノ基、チオール基、ハロゲン原子、エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基等を示し、ただし、R₁が脂肪族基の場合、R₃は水素原子ではない。Xは酸素原子または硫黄原子を示す。]

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式

【化1】

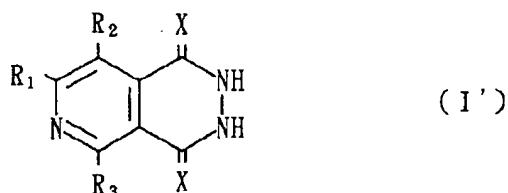


[式中、 R_1 はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基またはヘテロ環基を示し、 R_2 は水酸基、チオール基、アミノ基またはモノ置換アミノ基を示し、 R_2 がモノ置換アミノ基の場合、 R_2 は R_1 と一緒に環を形成していてもよい。 R_3 は水素原子、置換されていてもよい水酸基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいチオール基、ハロゲン原子、ヘテロ環基、ニトロ基、シアノ基、エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシ基、アジド基、スルホ基または有機スルホニル基を示し、ただし、 R_1 が脂肪族基の場合、 R_3 は水素原子ではない。Xは酸素原子または硫黄原子を示す。]で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩の化学発光を利用することを特徴とするアッセイ法。

【請求項2】 R_1 が、複合体形成反応可能な置換基を有する請求項(1)記載の一般式(I)で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩を用いる請求項(1)記載のアッセイ法。

【請求項3】 式

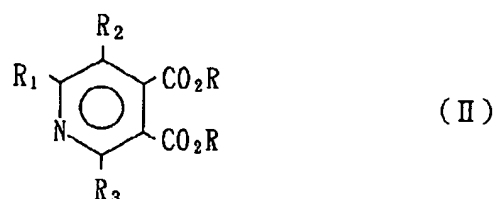
【化2】



[式中、 R_1 はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基またはヘテロ環基を示し、 R_2 は水酸基、チオール基、アミノ基またはモノ置換アミノ基を示し、 R_2 がモノ置換アミノ基の場合、 R_2 は R_1 と一緒に環を形成していてもよい。 R_3 は水素原子、置換されていてもよい水酸基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいチオール基、ハロゲン原子、ヘテロ環基、ニトロ基、シアノ基、エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシ基、アジド基、スルホ基または有機スルホニル基を示し、ただし、 R_3 が水素原子の場合、 R_1 は置換アリール基または置換されていてもよいヘテロ環基を示す。Xは酸素原子または硫黄原子を示す。]で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩。

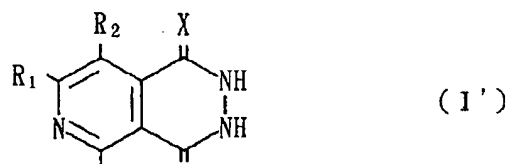
【請求項4】 式

【化3】



[式中、 R_1 はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基またはヘテロ環基を示し、 R_2 は水酸基、チオール基、アミノ基またはモノ置換アミノ基を示し、 R_2 がモノ置換アミノ基の場合、 R_2 は R_1 と一緒に環を形成していてもよい。 R_3 は水素原子、置換されていてもよい水酸基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいチオール基、ハロゲン原子、ヘテロ環基、ニトロ基、シアノ基、エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシ基、アジド基、スルホ基または有機スルホニル基を示し、ただし、 R_3 が水素原子の場合、 R_1 は置換アリール基または置換されていてもよいヘテロ環基を示し、Rは低級アルキル基を示す。]で表わされる化合物とヒドラジンとを反応させることを特徴とする一般式

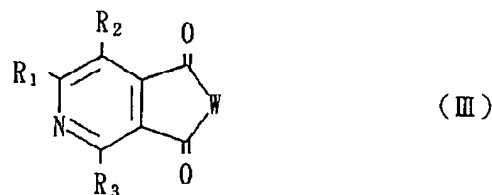
【化4】



[式中、 R_1 、 R_2 および R_3 は前記と同意義で、Xは酸素原子を示す。]で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩の製造法。

【請求項5】 式

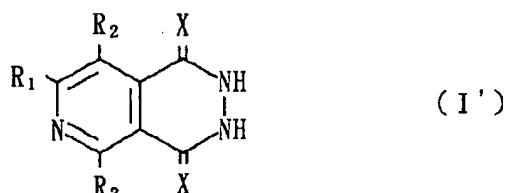
【化5】



[式中、 R_1 はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基またはヘテロ環基を示し、 R_2 は水酸基、チオール基、アミノ基またはモノ置換アミノ基を示し、 R_2 がモノ置換アミノ基の場合、 R_2 は R_1 と一緒に環を形成していてもよい。 R_3 は水素原子、置換されていてもよい水酸基、置換されていてもよいアミノ基、置換されていてもよいチオール基、ハロゲン原子、ヘテロ環基、ニトロ基、シアノ基、エステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシ基、アジド基、スルホ基または有機スルホニル基を示し、ただし、 R_3 が水素原子の場合、 R_1 は置換アリール基または置換されていてもよいヘテ

ロ環基を示し、Wは酸素原子またはR'が水素原子、低級アルキル基またはフェニル基である-NR'基を示す、]で表わされる化合物と、ヒドラジンとを反応させることを特徴とする一般式

【化6】



[式中、R₁、R₂およびR₃は前記と同意義で、Xは酸素原子を示す、]で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩の製造法。

【請求項6】 アミド結合を介して、R₁が複合体形成反応可能な置換基を有する請求項(1)記載の一般式(I)で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩と反応性物質とを化学結合させてなることを特徴とする化学発光性標識複合体。

【請求項7】 請求項(6)記載の化学発光性標識複合体を用いて液体サンプル中の微量物質を測定することを特徴とするアッセイ方法。

【請求項8】 過酸化水素を発生できる系を含む測定システムにおいて、請求項(1)記載の一般式(I)で表わされるピリドピリダジン誘導体またはその塩と、要すれば触媒を加えて化学発光反応を生じさせ、液体サンプル中の微量物質を測定することを特徴とするアッセイ方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、化学発光を利用する測定法において有用な化学発光性物質となるピリドピリダジン誘導体またはその塩およびその用途、さらに詳しくは、該ピリドピリダジン誘導体またはその塩を用いる高感度な測定法に関する。

【0002】

【従来技術および解決しようとする課題】化学発光反応に基づく分析手法は、極めて高感度な測定方法となり得る可能性があるため、活発な研究が展開されている。この分析手法は特に、免疫学的測定の分野で注目されており、種々の技術の導入が試みられている。すなわち、免疫学的測定においては、まず初めに、放射性同位元素をラベルとして用いる方法が開発されたが、放射性同位元素を用いることの欠点として、半減期の短いことや、放射能によるハザードの問題、さらに感度が不十分とされる場合があるなど改善が求められていた。ついで、酵素をラベルとする、いわゆる酵素免疫測定など比色や蛍光で検出する方法が開発され、RIAの有する欠点を克服する研究が進められた。しかしながら、なお、感度の向上が望まれ、新たな技術の展開が計られている。これらの中で、化学発光を検出手段として利用する方法は、最

も高感度が期待できるものとして研究が進められている。

【0003】化学発光反応を利用した免疫化学的測定法は大きく分けてつぎの4種に分類される(辻 章夫等、蛋白質 核酸 酵素、別冊第31巻(1988)252～263頁)。(1)標識化合物としてルミノールやイソルミノール、アクリジニウム誘導体などの化学発光性物質を抗体や抗原などに標識する方法、(2)酵素を抗体や抗原などに標識した酵素免疫測定法(EIA)において、酵素活性の測定に化学発光反応を利用する方法、(3)補酵素であるNADやATPを標識し、抗原抗体反応によりその補酵素活性が不活化する現象を利用したホモジニアスな免疫測定方法、(4)生物発光反応を用いる酵素免疫測定方法。

これらのうち、(1)においては、発光性物質を化学的に結合させることによって、発光量子収率が低下し、結果として期待した程に感度が向上しないこと、化学発光の生じている時間が極めて短時間であるので計測の面で無理があることなど若干の問題を内蔵している。(2)においては、化学発光性物質は溶液中で抗体や抗原などと結合していない状態で存在し、標識酵素により発光反応が触媒されるシステムである。(3)については感度の向上は望めないこと、(4)については酵素が特殊な場合が多く、方法として一般化し難いという欠点を有する。

【0004】このように、化学発光反応を利用する測定法は高感度が期待されていることから幾多の研究が実施されているが実際の測定系の確立において、例えば、線維芽細胞成長因子、神経成長因子、エンドセリン-1等、生体内に極く微量にしか存在しない物質の定量には必ずしも満足できる感度を与えるものではなかった。これらの問題点を解決するために種々の検討が行なわれ、その1つとして化学発光収率において優れた化合物の合成が必要とされている[今井一洋編、「生物発光と化学発光」、第75頁～第149頁、広川書店(1989年)]。例えば、ロフィン、ルミノール、ルシゲニンおよびそれらの誘導体が知られており、発光量子収率のより大きな化学発光性物質の特定もしくは合成研究は、従来より、数多くの研究者によりなされてきた。この中でルミノールおよびルミノール誘導体は極めて活発に研究されたものである。ルミノールの化学発光はアルブレヒト(Albrecht)によって見い出され[ツァイトシュリフト・フィジカリッシェ・ヘミイ(Z. Phys. Chem.)、136巻、321頁(1928年)]、現在までにおいて最も広く用いられている化合物である。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、発光量子収率のより大きな化学発光性物質として一般式

【0006】

【化7】



【0008】前記一般式(1)で示されるピリダジ
ン誘導体における置換基 R_1 の炭化水素の具体例として
は、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロ
ピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブ
チル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ヘキシルのような
直鎖状もしくは分枝鎖状の炭素数1〜6の低級アルキル
基;例えば、ビニール、アリルのような炭素数2〜3の
アルケニル基;例えば、エチニル、プロパルギルのよう
な炭素数2〜3のアルキニル基;例えば、ベンジル、フ
ェネチルのような炭素数7〜12のアラルキル基;例え
ば、フェニル、ナフチルのような炭素数6〜10のアリ
ール基が挙げられる。また、窒素、硫黄または酸素の少
なくとも1個、好ましくは1〜4個のヘテロ原子を含
む、不飽和または飽和された5ないしは6員環のヘテロ
環基としては、2-ピリジル、4-ピリジル、2-チエ
ニル、2-フリル、イミダゾリル、トリアゾリル、テト
ラゾリル、モルホリノ、ピペラジニル、4-チアゾリ
ル、2-アミノ-4-チアゾリルなどが挙げられる。こ
れらの置換基 R_1 が有していてもよい置換基としては、
式

【化8】

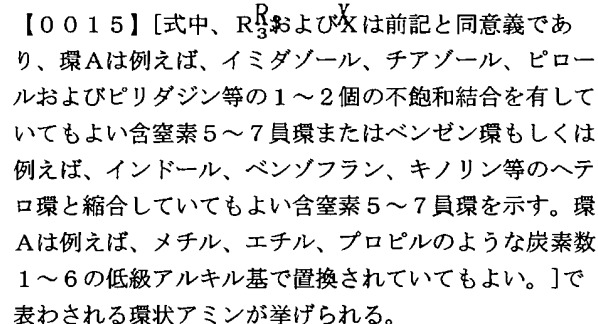
HR₆であり、Aは硫黄、酸素、窒素原子を、nは1～4の整数を意味し、Mはアルカリ金属または水素原子を、halはフッ素、塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲン原子を示す。R₅は水素原子あるいはメチル、エチル、プロピルのような低級アルキル基またはマレイミド、スクシニミドもしくは5-ノルボルネン-2,3-カルボキシイミド基のような複合体形成可能な活性イミドエステルを形成する基、R₆は水素原子または式

【化9】



【0013】一般式(I)で示される置換基 R_2 におけるモノ置換アミノ基の置換基の具体例としては、例えば、 R_1 で例示したような直鎖状または分枝鎖状の炭素数1～6の低級アルキル基、炭素数2～3のアルケニル基、炭素数2～3のアルキニル基、炭素数7～12のアラルキル基および炭素数6～10のアリール基が挙げられる。また、 R_2 が置換基 R_1 と一緒に環を形成していてもよいモノ置換アミノである場合の化合物の具体例としては、一般式

【化 10】



-4-

基が、また、アラルキルオキシ基のアラルキル基としてはベンジル、フェネチル等の炭素数7～12のアラルキル基が挙げられる。 R_3 で示される置換されていてもよいアミノ基としては、例えばアミノ基、モノ置換アミノ基、ジ置換アミノ基が挙げられる。モノ置換アミノ基の置換基としては、例えば、 R_1 で例示したような直鎖状もしくは分枝鎖状の炭素数1～6の低級アルキル基;例えば、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルのような炭素数3～6のシクロアルキル基;例えば、ビニル、アリルのような炭素数2～3のアルケニル基;例えば、エチニル、プロパルギルのような炭素数2～3のアルキニル基;例えば、ベンジル、フェネチルのような炭素数7～12のアラルキル基;例えば、フェニル、ナフチルのような炭素数6～10のアリール基が挙げられる。ジ置換アミノ基における置換基としては、前記モノ置換アミノ基の置換基が、同一または異なって用いられる。

【0017】 R_3 で示される置換されていてもよいチオール基としては、例えばチオール基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アラルキルチオ基が挙げられる。アルキルチオ基のアルキル基としては、 R_1 で例示したような直鎖状もしくは分枝鎖状の炭素数1～6の低級アルキル基が、アリールチオ基のアリール基としては、例えば、炭素数6～10のフェニル、ナフチルが、また、アラルキルチオ基のアラルキル基としては、例えば、炭素数7～12のベンジル、フェネチルが挙げられる。

【0018】 R_3 で示されるハロゲン原子としては、よう素、臭素、塩素、フッ素が挙げられる。 R_3 で示されるヘテロ環基としては、 R_1 について挙げたヘテロ環基が挙げられる。 R_3 で示されるエステル化またはアミド化されていてもよいカルボキシル基としては、例えば、カルボキシル基、カルバモイル基およびアルコキシカルボニル基が挙げられる。 R_3 で示されるエステル化カルボキシル基としてのアルコキシカルボニル基におけるアルキル基としては、 R_1 について挙げたアルキル基が挙げられる。 R_3 で示される有機スルホニル基は、アルキ

ルスルホニル基およびアリールスルホニル基を包含する。アルキルスルホニル基におけるアルキル基およびアリールスルホニル基におけるアリール基としては、例えば、それぞれ R_1 について挙げたアルキル基およびアリール基が挙げられる。アリール基、特にフェニル基は、メチルまたはエチルのような低級アルキル基で置換されていてもよい。一般式(I)で表されるピリドピリダジン環のカルボニルまたはチオカルボニル基は、容易にエノル化して、一価または二価のカチオンと塩を形成することができる。

【0019】一価のカチオンとしては、アンモニウムイオンやアルカリ金属が挙げられ、たとえば、アンモニア、メチルアミン、エチルアミン、ブチルアミンなどの $C_{1\sim4}$ モノアルキルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジブチルアミンなどのジ($C_{1\sim4}$)アルキルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミンなどのトリ($C_{1\sim4}$)アルキルアミン、ピリジニウムあるいはヒドラジニウム等のアンモニウムイオンやリチウム、カリウム、ナトリウムなどのアルカリ金属が挙げられる。二価のカチオンとしては、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属が挙げられる。

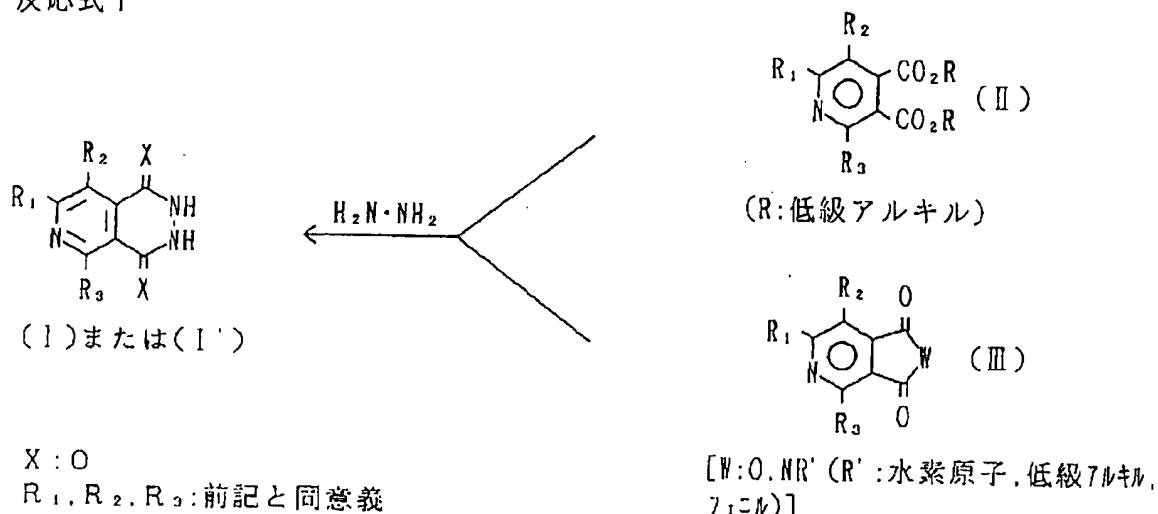
【0020】一般式(I)で表される化合物のうち、 R_1 がフェニル、 R_2 がアミノ、 R_3 がクロル、Xが酸素である化合物(L-012)のナトリウム塩がとりわけ好ましい。

【0021】一般式(I)の化合物は、本発明の一般式(I')の新規化合物も含め、以下の反応式1に従って製造できる。すなわち、一般式(I)で表わされる新規ピリドピリダジンまたはその塩は、一般式(II)または(III)で表される化合物にヒドラジンを反応させる自体公知の方法によって製造することができる。なお、以下の式における R 、 R' および R'' で表わされる低級アルキル基としては、 R_1 で示したような炭素数1～6のアルキル基が挙げられる。

【0022】

【化11】

反応式 1



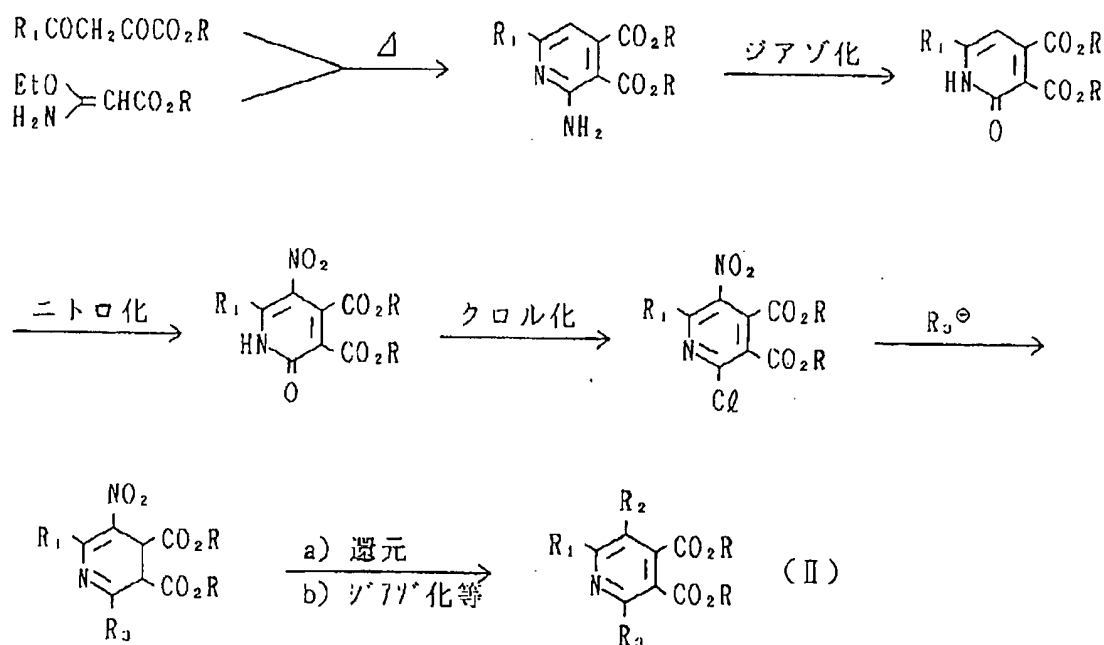
【0023】化合物(II)は、例えば、上野ら[薬学雑誌、82、532(1962)]の方法によって合成した2-アミノニコチン酸エステル誘導体を反応式2に示すごとく、ユルギらの方法[Yurugi et al., Chem. Pharm. Bull., 24、2699(1976)]に従ってジアゾ化、ニトロ化、クロル化反応に順次付し、ついで、活性なク

ロール原子に対する求核置換反応後、ニトロ基を還元、必要とあればさらにジアゾ化反応に付すことによって得ることができる。

【0024】

【化12】

反応式 2



R: 低級アルキル

R₁, R₂, R₃: 前記と同意義

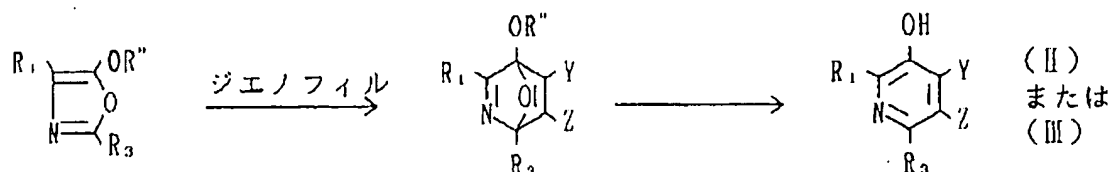
【0025】また、以下の反応式3に示すごとく、松尾ら[薬学雑誌、92、703(1972)]の方法に従って、オキサゾール誘導体と適当なジエノフィル(dienophile)とのディールス-アルダー(Diels-Alder)反応を



行なうことにより化合物(II)または(III)を得ることができる。

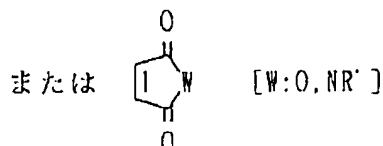
【0026】

【化13】

反応式 3



ジエノフィル:  または  [Y, Z: 同一または異なって CN, CO₂R]



R'': 低級アルキル、R': 低級アルキル、フェニル、水素原子

R: 低級アルキル、R₁, R₂, R₃: 前記と同意義

【0027】化合物(II)または(III)とヒドラジンとの反応は通常無溶媒または溶媒中で加熱することにより行なわれる。溶媒としてはメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール等の低級アルコール、およびテトラヒドロフラン、ジオキサンの様なエーテル、または酢酸が用いられる。反応温度は15℃ないし120℃が最適である。また、(II)のRがHであるカルボン酸の場合にはヒドラジンの代りに、3,3-ジメチルジアジリジンのようなヒドラジン誘導体を用いてもよい。

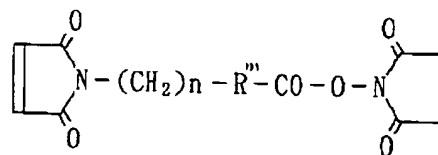
【0028】一般式(I)のピリドピリダジン誘導体またはその塩は優れた化学発光収率を示し、その化学発光反応を利用して種々のアッセイ方法に利用することができる。具体的には、例えば、次のような方法が挙げられる。(1)標識化合物として、一般式(I)のピリドピリダジン誘導体またはその塩で抗体、ハプテン、抗原または核酸等を標識する方法、(2)酵素で抗体、ハプテン、抗原または核酸等を標識し、酵素免疫測定法や核酸ハイブリダイゼーション法等において、酵素活性の測定に一般式(I)のピリドピリダジン誘導体またはその塩の化学発光反応を利用する方法などが有利に用いられる。

【0029】(1)の方法としては、まずピリドピリダジン誘導体、例えば、7-[4-(3-アミノプロピルオキシ)フェニル]-8-ヒドロキシピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4-(2H,3H)ジオン(以下L-011と称することがある)またはその塩を前記の被標識物質に結合させる。結合させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、グルタルアルデヒド架橋法[イムノケミストリー(Immunochimistry)、第6巻(1969年)、第43頁、同誌、第8巻(1971年)、第1175頁]、過ヨウ素酸架橋法[ジャーナル・オブ・ヒストケミストリー・アンド・サイトケミストリー(J. Histochem. Cytochem)、第22巻(1974年)、第10

84頁]、あるいは特開昭58-149700号公報記載の一般式:

【0030】

【化14】



【0031】[式中、nは0~5の整数を、R''は化学結合または6員環状炭化水素残基をそれぞれ示す。]で表わされる結合剤を用いる方法等が特に有利に用いられる。

【0032】さらに、一つの方法として、前記のピリドピリダジン誘導体を無水こはく酸を用いてヘミスクシネートとし、さらに、N-ヒドロキシスクシンイミドとカルボジイミドとで活性エステルとし、次に抗体、ハプテン、抗原または核酸等のアミノ基と反応させて標識化することができる。当然のことながら当該分野で用いられるカップリング技術が適用できる。かくして得られたピリドピリダジン誘導体標識体を用いる測定試薬の一例として、サンドイッチ法による免疫化学的測定キットを以下に挙げる。

【0033】(1) 担体上に保持された抗体

(2) ピリドピリダジン誘導体またはその塩標識抗体

(3) 被測定物質の標準品

(4) これら(2)~(3)の試薬および被検試料の希釈に用いる緩衝液(該試薬および該被検試料の希釈に用いることができる緩衝剤であればいずれでもよいが、その一例としてはpH6~9のリン酸緩衝液またはグリシン緩衝液が挙げられる。)

(5) インキュベーション後、担体の洗浄に用いる緩衝

液(該担体の洗浄に用いることができる緩衝液であればいずれでもよいが、その一例としてはリン酸緩衝液またはグリシン緩衝液が挙げられる。)

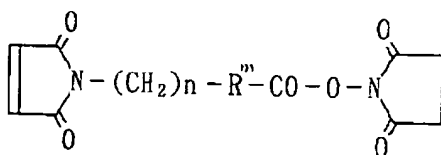
(6) ピリドピリダジン誘導体またはその塩を化学発光させるに必要な試薬(その一例としてアルカリ性溶媒に溶解させた過酸化水素とマイクロペルオキシダーゼが挙げられる。)

【0034】このキットは、例えば、以下の方法により使用することができる。被測定物質の標準品もしくは被検液約10～200μlに試薬(4)を加えて希釈し、一定量の試薬(1)、次いで試薬(2)10～800μlを加えた後、約0～40℃で反応させる。約10分～48時間反応後、試薬(5)で洗浄し担体上に結合しているピリドピリダジン誘導体またはその塩を化学発光させる。すなわち、化学反応液約10～1000μlを加えて直ちに化学発光測定器にかけ、反応液中の化学発光量を測定する。

【0035】(2)の方法としては、例えば、通常の酵素免疫測定法において用いられる酵素と抗原、ハプテン、抗体等と共有結合させて標識体を作製する必要がある。酵素として、例えば、ペルオキシダーゼを上記の免疫化学的活性物質に結合させる方法としては、自体公知の方法を用いることができる。例えば、グルタルアルデヒド架橋法[イムノケミストリー(Immunochimistry)、第6巻(1969年)、第43頁、同誌、第8巻(1971年)、第1175頁]、過ヨウ素酸架橋法[ジャーナル・オブ・ヒストケミストリー・アンド・サイトケミストリー(J. Histochem. Cytochem.)、第22巻(1974年)、第1084頁]、あるいは特開昭58-149700号公報記載の一般式:

【0036】

【化15】



【0037】[式中、nは0～5の整数を、R'''は化学結合または6員環状炭化水素残基をそれぞれ示す。]で表わされる結合剤を用いる方法が特に有利に用いられる。

【0038】かくして得られた酵素標識体を用いる測定試薬の一例として、サンドイッチ法による免疫化学的測定キットを以下に挙げる。

(1) 担体上に保持された抗体

(2) 酵素で標識した免疫化学的活性物質

(a)酸化剤(過酸化水素)

(b)エンハンサー

(c)ピリドピリダジン誘導体またはその塩

とりわけ、(a)としては、20μM～2mM、(b)として

(3) 被測定物質の標準品

(4) これら(2)～(3)の試薬および被検試料の希釈に用いる緩衝液(該試薬および該被検試料の希釈に用いることができる緩衝剤であればいずれでもよいが、その一例としてはpH6～9のリン酸緩衝液またはグリシン緩衝液が挙げられる。)

(5) インキュベーション後、担体の洗浄に用いる緩衝液(該担体の洗浄に用いることができる緩衝液であればいずれでもよいが、その一例としてはリン酸緩衝液またはグリシン緩衝液が挙げられる。)

(6) 酵素活性測定に必要な試薬(一例として酸化剤(過酸化水素もしくはその類似体)、ピリドピリダジン誘導体またはその塩さらに必要により化学発光増強剤(エンハンサー)が挙げられる。)

【0039】このキットは、例えば、以下の方法により使用することができる。被測定物質の標準品もしくは被検液約10～200μlに試薬(4)を加えて希釈し、一定量の試薬(1)、次いで試薬(2)10～800μlを加えた後、約0～40℃で反応させる。約10分～48時間反応後、試薬(5)で洗浄し担体上に結合している酵素活性を測定する。例えば、ペルオキシダーゼ活性測定時において、ピリドピリダジン誘導体またはその塩、酸化剤およびエンハンサーはそれぞれ一定量が用いられ、化学発光量が微量領域のペルオキシダーゼの変化量に応じて敏感に変化する条件が選ばれる。化学発光反応は、エンハンサーの採用により、発光反応の遅延が生じ、また、発光量においても増大が認められることは公知である[トルペ(Thorpe)ら、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第145巻、第96頁～第100頁(1985年); エム・エイ・デルカ(M. A. DeLuca)編、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第331頁～第353頁(1986年)、アカデミック・プレス(Academic Press)社]。

【0040】化学発光反応においては、通常、以下の条件で実施されることが望ましい。反応温度としては0～60℃の範囲の温度、特に、5～30℃が望ましい。用いる緩衝液のpHは、中性付近からアルカリ性の領域、例えば、pH7～10、望ましくは、pH7.5～9とすることができる。用いる緩衝液としては、各種緩衝液を用いることができるが、ホウ酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液等が有利に用いることができる。

【0041】試薬濃度としては、用いるエンハンサーの種類によって異なるが、一般的に以下の濃度が好ましい。

1μM～30mM

0.1μM～10mM

1μM～10mM

は4μM～1mM、(c)としては10μM～2mMが望ま

しい。

【0042】先の担体上に結合しているペルオキシダーゼに(a)~(c)を共存させて、化学発光反応を行なわせる。反応溶液から生じた光を、市販もしくは、自作の測定装置(例えば、高感度な光電子増倍管を備えたフォトカウンタなど)で測定することができる。すなわち、最後の液を加えてから、数秒ないし数十分後の数秒ないし数分間における発光量を測定することで定量に供することができる。すなわち、計測された発光量と、例えば、ペルオキシダーゼ量との間に、良好な相関性が認められることになり、この関係から分析が可能となる。

【0043】さらに別のタイプの方法として、例えば、担体上に結合しているグルコースオキシダーゼにグルコースを反応させて酵素量に対応した過酸化水素を発生せしめ、反応触媒として、例えば、ミクロペルオキシダーゼを用いてピリドピリダジン誘導体またはその塩を化学発光させることができる。反応溶液から生じた光を、市販もしくは、自作の測定装置(例えば、高感度な光電子増倍管を備えたフォトカウンタなど)で測定することができる。すなわち、最後の液を加えてから、数秒ないし数十分後の数秒ないし数分間における発光量を測定することで定量に供することができる。すなわち、計測された発光量と、例えばグルコースオキシダーゼ量との間に、良好な相関性が認められることになり、この関係から分析が可能となる。

【0044】さらに異なったタイプの方法としてリポソームを利用するシステムが有効な測定手段を提供する。人工的に作製したリポソームの中に、例えば、(イ) ピリドピリダジン誘導体またはその塩もしくは(ロ) 化学発光反応を触媒する物質、例えば、ペルオキシダーゼなどの触媒、マイクロペルオキシダーゼやポリフィン構造を有する化合物等を封入し、リポソームの表面に免疫化学的活性物質、例えば、抗原、抗体、ハプテン等を共有結合で固定する。リポソームの調製法としては自体公知の方法で行なうことができる。例えば、コレステロール、レシチン、ホスファチジン酸さらに少量の標識用の成分(ジチオピリジルホスファチジルエタノールアミンなど)を加えた混合液から調製することができる。自体公知の方法でアッセイを実施し、測定読み取り段階において、リポソームに、例えば、補体あるいはリポソーム膜を破壊できる物質(酸、塩基、塩など)を添加して、中に存在する物質を溶液中に移動させる。

【0045】(イ)の場合は、例えば、必要により酸化剤と触媒(ペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼやポリフィン構造を有する化合物)を共存させてピリドピリダジン誘導体またはその塩を化学発光させることができる。(ロ)の場合は、例えば、ピリドピリダジン誘導体またはその塩と必要により酸化剤を共存させてピリドピリダジン誘導体またはその塩を化学発光させることができる。これらの化学発光反応において、適当な化学発

光増強剤(エンハンサー)を共存させてもよい。反応溶液から生じた光を、市販もしくは、自作の測定装置(例えば、高感度な光電子増倍管を備えたフォトカウンタなど)で測定することができる。すなわち、最後の液を加えてから、数秒ないし数十分後の数秒ないし数分間における発光量を測定することで定量に供することができる。以上のような方法を用いることにより生体に微量にしか存在しない例えば塩基性および酸性線維芽細胞成長因子(FGF)、神経成長因子(NGF)、エンドセリン等を抽出操作することなく直接測定することが可能となる。それにより、これら微量にしか存在しない物質の増加あるいは減少と疾患の関係、例えばFGFと癌、NGFと神経系疾患、エンドセリンと脈管系疾患の関係が明確になることが期待され、高感度測定法が疾病の早期診断法として利用できる。

【0046】

【実施例】以下に参考例および実施例を挙げ本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

参考例1

フェニルグリシンエチルエステル塩酸塩

D-フェニルグリシン(30.0g)をエタノール500mlに懸濁し、氷冷下、塩酸ガス(約250g)を吹き込み、室温で一晩放置した。溶媒を留去し、得られた結晶をジエチルエーテルを用いてろ取した。収量27.7g(64.7%)。NMR(CDCl₃) δ: 1.13(3H, t, J=7.2 Hz)、4.12(2H, q, J=7.2 Hz)、5.13(1H, s)、5.42(5H, m)、9.17(3H, br.)。IR(KBr) ν: 2980-2900、1755、1738、1495、1235、700 cm⁻¹。

【0047】参考例2

N-ホルミルフェニルグリシンエチルエステル

フェニルグリシンエチルエステル塩酸塩(21.5g; 0.1モル)を、ギ酸200mlに溶かし、ギ酸ナトリウム(8.16g; 1.2eq)を加え、無水酢酸(20ml; 2.1eq)を滴下した。2時間攪拌後、無水酢酸10mlを滴下し、50-60℃で1.5時間攪拌した。溶媒を留去後、炭酸水素ナトリウム水で中和し酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥、溶媒を留去し、油状生成物を得た。収量22.7g。NMR(CDCl₃) δ: 1.20(3H, t, J=7.2 Hz)、4.18(2H, dq, J=2.4、7.2 Hz)、5.63(1H, d, J=7.5 Hz)、6.78(1H, br.)、7.33(5H, s)、8.22(1H, s)。IR(neat) ν: 2980、1640、1520、1495、1380、1350、1015 cm⁻¹。

【0048】参考例3

5-エトキシ-4-フェニルオキサゾール

五酸化リン(32g; 2.1eq)、ハイフラスーパーセル(登録商標)(9g)、ジクロロエタン(120ml)を、50

−60℃で激しく攪拌し、N-ホルミルフェニルグリシンエチルエステル22.7gを40分間で滴下した。ジクロロエタン30mlを加えて8時間攪拌した。氷冷下、炭酸水素ナトリウム(80g/水100ml)を加え中和後、ろ過し有機層を得た。水層をジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を合わせて硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:ジクロロメタン-ヘキサン1:1)で精製し、赤色油状物質を得た。収量9.7g(46.8%)。

NMR(CDCl₃) δ: 1.44 (3H, t, J=6.9 Hz), 4.33 (2H, q, J=6.9 Hz), 7.23 (3H, m), 7.49 (1H, s), 7.82 (2H, d, J=6.9 Hz)。

IR(neat) ν: 2980, 1640, 1520, 1495, 1380, 1350, 1015 cm⁻¹。

【0049】参考例4

トランス-3,6-エポキシ-3-エトキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-2-フェニル-3,4,5,6-テトラヒドロピリジン

5-エトキシ-4-フェニルオキサゾール(9.7g; 51.3ミリモル)に、フマル酸ジメチル(8.13g; 1.1eq)を加え、120℃で反応させた。2時間後フマル酸ジメチル(2.2g; 0.3eq)を追加し、さらに1.5時間攪拌した。反応残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:ジクロロメタン)で精製し、粗結晶を得た。ジクロロメタン-ヘキサンから再結晶し無色針状晶を得た。収量6.53g(38.2%)。融点98.5-99.5℃。

NMR(CDCl₃) δ: 1.33 (3H, t, J=6.9 Hz), 3.30 (1H, d, J=4.2 Hz), 3.40 (3H, s), 3.62 (1H, d, J=4.2 Hz), 3.78 (3H, s), 3.90 (2H, m), 6.04 (1H, s), 7.40 (2H, m), 7.43 (1H, m), 7.99 (2H, m)。

IR(KBr) ν: 1725, 1310, 1295, 1200, 1170, 985 cm⁻¹。

元素分析: 計算値C:61.25; H:5.75; N:4.20; 測定値C:61.07; H:5.75; N:4.05。

【0050】参考例5

8-ヒドロキシ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-002)

3,6-エポキシ-3-エトキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-2-フェニル-3,4,5,6-テトラヒドロピリジン(500mg; 1.5ミリモル)をヒドラジン-水混合物(5ml)に加え、窒素気流下、100℃で1時間加熱した。氷冷下、反応液に水を加え酢酸で中和した。析出した黄色粉末状結晶をろ取した。収量210mg(55.0%)。融点300℃以上。

NMR(DMSO-d₆) δ: 7.41 (3H, m), 8.17 (2H, m), 8.73 (1H, s)。

IR(KBr) ν: 3420, 3175, 3050, 1650, 1580 cm⁻¹。

【0051】参考例6

N-Boc-p-ヒドロキシフェニルグリシン

p-ヒドロキシフェニルグリシン33.4g(0.2モル)に水110ml、トリエチルアミン42ml(1.5eq)、S-4,6-ジメチルピリミジン-2-イルチオールカルボン酸 t-ブチル52.8g(1.1eq)、ジオキサン110mlを加え室温で14時間攪拌した。反応液に水300mlを加え400ml酢酸エチルで抽出し、有機層を100mlの5%炭酸水素ナトリウム水で抽出、水層と合わせた。水層を氷冷下5N塩酸でpH3とし、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸水素カリウム水、飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウムを用いて乾燥、溶媒を留去した。得られた結晶を酢酸エチル-ヘキサンを用いてろ取した。収量46.0g(86.1%)。NMR(DMSO-d₆) δ: 1.38 (9H, s), 4.92 (1H, d, J=7.8 Hz), 6.67 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.13 (2H, d, J=8.4 Hz)。

【0052】参考例7

N-Boc-p-メトキシフェニルグリシンメチルエステル

メタノール200mlにナトリウム8.3g(2.2eq)を溶かし、氷冷後N-Boc-p-ヒドロキシフェニルグリシン46.0gを加え、次いでヨードメタン23.6ml(2.2eq)を滴下し2日間放置した。ヨードメタン23.6mlを滴下し、5時間40-50℃に加温した。2時間還流後、溶媒を留去し、DMF100ml、ヨードメタン20mlを加え40-50℃に加温した。ヨードメタンを除去後、氷水500mlを加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウムを用いて乾燥、溶媒を留去し、シリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン1:1)で精製して無色針状晶を得た。収量37.0g(72.7%)。

NMR(CDCl₃) δ: 1.43 (9H, s), 3.71 (3H, s), 3.80 (3H, s), 5.22 (1H, d, J=7.5 Hz), 5.45 (1H, br.), 6.87 (2H, d, J=6.0 Hz), 7.28 (2H, d, J=6.0 Hz)。

【0053】参考例8

N-ホルミル-p-メトキシフェニルグリシンメチルエステル

N-Boc-p-メトキシフェニルグリシンメチルエステル36.9gを酢酸250mlに溶かし室温で3時間、40-50℃で1時間攪拌した。無水酢酸24.8ml(2.1eq)を滴下し、室温で一晩、40-50℃で2時間攪拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウム水で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウムを用いて乾燥、溶媒を留去し、結晶をヘキサンを用いてろ取した。収量24g(86.1%)。融点97-99℃。

NMR(CDCl₃) δ: 3.73 (3H, s), 3.79 (3H, s), 5.57 (1H, d, J=7.5 Hz), 6.60 (1

H, br.), 6.87 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.28 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 8.22 (1H, s)。

IR (KBr) ν : 3340, 1745, 1670, 1515, 1320, 1180 cm^{-1} 。

【0054】参考例9

5-エトキシオキサゾール

五酸化リン(30g; 2.1 eq)、ハイフロスーパーセル(17.5g)、ジクロロエタン(175ml)を、60-70℃で激しく攪拌し、N-ホルミルグリシンエチルエステル12.86gを50分間で滴下し、8時間攪拌した。氷冷下、炭酸水素ナトリウム(100g/水100ml)を加え中和後、ろ過し有機層を得た。水層をジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を合わせて硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン1:2)で精製し、油状物質を得た。収量560mg(5%)。

NMR (CDCl_3) δ : 1.42 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 4.13 (2H, q, $J=7.2$ Hz), 6.11 (1H, s), 7.33 (1H, s)。

【0055】参考例10

3,4-ジメトキシカルボニル-5-ヒドロキシピリジン

5-エトキシオキサゾール(557.3mg; 4.9ミリモル)に、フマル酸ジメチル(781mg; 1.1eq)を加え、120℃で1.5時間反応させた。反応残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン2:1)で精製し、粗結晶を得た。収量730mg(70.2%)。ジクロロメタン-ヘキサンから再結晶し無色板状晶を得た。融点136-137℃。

NMR (CDCl_3) δ : 3.91 (3H, s), 3.95 (3H, s), 8.28 (1H, s), 8.54 (1H, s), 9.92 (1H, s)。

IR (KBr) ν : 1745, 1730, 1435, 1320, 1300, 1285 cm^{-1} 。

【0056】参考例11

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン100mg、トリエチルアミン0.08ml(2.0eq)、酢酸エチル8mlを10% Pd-C(50%湿潤)100mgを用いて、7時間接触還元した。ろ過により触媒を除き、溶媒を留去した。収量86mg(95.4%)。

NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.37 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.39 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 4.38 (4H, q, $J=7.2$ Hz), 5.17 (2H, s), 7.48-7.65 (5H, m), 8.33 (1H, s)。

IR (neat) ν : 3475, 3355, 2975, 1720, 1600, 1405, 1280, 1240 cm^{-1} 。

【0057】参考例12

8-アミノ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4-(2H,3H)ジオン(L-010)

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン200mgにヒドラジン1水和物2mlを加え100℃、1時間、窒素気流下加熱した。氷冷下、反応液に水を加え、塩酸で中和、pH5とし、生じた黄色粉末状結晶をろ取した。収量93mg(57.5%)。融点300℃以上。

NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7.19 (2H, s), 7.48-7.71 (5H, m), 8.39 (1H, s)。

IR (KBr) ν : 3430, 1640 cm^{-1} 。

【0058】参考例13

エチルベンゾイルピルベート

ナトリウム25g(1.08eq)をエタノール560mlに溶かし、しゅう酸ジエチル135.6ml(146g; 1モル)、アセトフェノン116.7ml(120g; 1モル)の混合物を40℃で滴下し、1時間後、30分間還流した。溶媒を留去し、硫酸55g/水200mlで中和、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水、飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去し、シリカゲルカラム(溶出溶媒:ジクロロメタン-ヘキサン1:1)で精製し無色板状晶を得た。酢酸エチル-ヘキサンを用いてろ取した。収量114.6g(52.0%)。

NMR (CDCl_3) δ : 1.42 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 4.40 (2H, d, $J=7.0$ Hz), 7.08 (1H, s), 7.57 (3H, m), 8.02 (2H, dd, $J=2.1, 7.5$ Hz)。

【0059】参考例14

エチル3-アミノ-3-エトキシアクリレート

シアノ酢酸エチル226g(2モル)、エタノール101g(2.2モル)、乾燥ジエチルエーテル100gに氷冷下、塩酸ガス93.5g(1.3eq)を吹き込み一晩放置した。析出した無色プリズム晶をジエチルエーテルを用いてろ取した(塩酸塩)。収量352.5g(90.3%)。融点103-105℃。

NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.23 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.37 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 3.94 (2H, br.), 4.15 (2H, q, $J=7.2$ Hz), 4.51 (2H, q, $J=6.8$ Hz)。得られた結晶を氷冷した炭酸水素ナトリウム200g(1.2eq)水溶液に加えジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去し、減圧蒸留により精製した。収量253.8g(79.7%)。沸点 t_b 78℃。

IR (neat) ν : 2980, 1660, 1610, 1540, 1160, 1070 cm^{-1} 。

【0060】参考例15

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-フェニルピリジン塩酸塩

エチルベンゾイルピルベート1.11g(5ミリモル)、エ

チル3-アミノ-3-エトキシアクリレート1.75g (2.2eq)を100℃で1.5時間加熱した。減圧で低沸点物質を留去した後、反応液に10%塩酸2mlを加え、生じた結晶をジエチルエーテルを用いてろ取した。酢酸エチルから再結晶し淡黄色針状晶を得た。収量0.7g (39.8%)。融点78-81、145-148℃(二重融点)。

NMR(CDCl₃) δ: 1.26 (3H, t, J=7.5 Hz), 1.30 (3H, t, J=7.5 Hz), 4.27 (2H, q, J=7.5 Hz), 4.28 (2H, q, J=7.5 Hz), 7.17 (1H, s), 7.43 (3H, m), 8.05 (2H, m)。

IR(KBr) ν: 1740, 1700, 1650, 1300 cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₇H₁₈N₂O₄·HCl) C: 58.21; H: 5.46; N: 7.99。測定値 C: 58.45; H: 5.48; N: 8.04。

【0061】参考例16

3,4-ジエトキシカルボニル-6-フェニル-2-ピリドン

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-フェニルピリジン塩酸塩3.50g(10ミリモル)を2%塩酸90ml、ジオキサン60mlに溶かし、亜硝酸ナトリウム0.83g(1.2eq)を水3mlに溶かして滴下した。室温で4時間攪拌し、一晩放置した。溶媒を留去し析出した結晶を水を用いてろ取した。エタノールから再結晶し淡黄色ブリズム晶を得た。収量1.9g(60.3%)。融点143-144℃。

NMR(CDCl₃) δ: 1.33 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.36 (3H, t, J=7.2 Hz), 4.37 (4H, q, J=7.2 Hz), 6.95 (1H, s), 7.47 (3H, m), 7.79 (2H, m)。IR(KBr) ν: 2900-3000, 1740, 1635, 1615, 1245 cm⁻¹。
元素分析: 計算値(C₁₇H₁₇NO₅) C: 64.75; H: 5.43; N: 4.44。測定値 C: 64.82; H: 5.55; N: 4.46。

【0062】参考例17

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-フェニル-2-ピリドン5.0gを無水酢酸13mlに懸濁し、-10℃に冷却し発煙硝酸1.32ml(2.0eq)を1時間で滴下、そのまま45分間攪拌した。水40mlを加え室温で攪拌し、一晩放置した。生じた結晶をろ取、乾燥した。収量4.61g(80.7%)。エタノールから再結晶し淡黄色針状晶を得た。融点172-173℃。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H, t, J=7.1 Hz), 1.38 (3H, t, J=7.1 Hz), 4.40 (2H, q, J=7.1 Hz), 4.42 (2H, q, J=7.1 Hz), 7.52 (5H, m)。

IR(KBr) ν: 3450, 1740, 1650, 1525, 1345, 1285 cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₇H₁₆N₂O₇) C: 56.67; H: 4.48; N: 7.77。測定値 C: 56.96; H: 4.56; N: 7.60。

【0063】参考例18

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン1.0gに二塩化フェニルホスホン酸1.3ml(3.37eq)を加え、150℃、2.5時間加熱した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムを用いて乾燥した。溶媒を留去し残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン1:2)で精製し油状生成物を得た。収量950mg(90.5%)。

NMR(CDCl₃) δ: 1.35 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.42 (3H, t, J=7.2 Hz), 4.44 (4H, q, J=7.2 Hz), 7.52 (5H, m)。

IR(KBr) ν: 2990, 1750, 1580, 1550 cm⁻¹。

【0064】参考例19

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン400mg、還元鉄520mg、エタノール4mlを60℃に加温し濃塩酸2.3mlを30分間で滴下した。氷冷下飽和炭酸水素ナトリウム水を用いて中和しジクロロメタンで抽出した。有機層を乾燥後、溶媒を留去し結晶を得た。収量337mg(91.5%)。ジクロロメタン-ヘキサンから再結晶し淡黄色ブリズム晶を得た。融点93-94℃。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.43 (3H, t, J=7.0 Hz), 4.37 (2H, q, J=7.0 Hz), 4.43 (2H, q, J=7.0 Hz), 5.93 (2H, m), 7.48-7.57 (5H, m)。

IR(KBr) ν: 3510, 3400, 1760, 1725, 1615, 1265 cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₇H₁₇N₂O₄Cl) C: 58.54; H: 4.91; N: 8.03。

測定値 C: 58.47; H: 4.87; N: 7.97。

【0065】参考例20

5-メトキシ-4-(p-メトキシフェニル)オキサゾール

五酸化リン(30g; 2.1eq)、ハイフろスーパーセル(登録商標)(17.5g)、ジクロロエタン(150ml)を、50-60℃で激しく攪拌し、ジクロロエタン50mlに溶かしたN-ホルミル-p-メトキシフェニルグリシンメチルエステル(参考例8)22.3g(0.1モル)を滴下し、一晩攪拌した。氷冷下、炭酸水素ナトリウム(10

0g/水100ml)を加え中和後、ろ過し有機層を得た。水層をジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を合わせて硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン1:2)で精製し、黄色針状晶を得た。収量10.2g(49.8%)。

NMR(CDCl₃) δ: 3.82(3H, s)、4.03(3H, s)、6.92(2H, d, J=8.7Hz)、7.44(1H, s)、7.72(2H, d, J=8.7Hz)。

【0066】参考例21

シス-3,6-エポキシ-3-メトキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-2-(p-メトキシフェニル)-3,4,5,6-テトラヒドロピリジン

5-メトキシ-4-メトキシフェニルオキサゾール200mgと、マレイン酸ジメチル157mg(1.1eq)を120℃で1.5時間加熱した。シリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン1:1)で精製した。エキソ体:無色板状晶。収量130mg(38.2%)。融点148-150℃。

NMR(CDCl₃) δ: 3.04(2H, s)、3.50(3H, s)、3.72(3H, s)、3.74(3H, s)、3.85(3H, s)、6.24(1H, s)、6.98(2H, d, J=8.7Hz)、7.96(2H, d, J=8.7Hz)。

エンド体:無色プリズム晶。収量40mg(11.8%)。

NMR(CDCl₃) δ: 3.49(3H, s)、3.57(3H, s)、3.65(3H, s)、3.83(2H, m)、3.86(3H, s)、5.99(1H, d, J=3.6Hz)、6.92(2H, d, J=9Hz)、8.04(2H, d, J=9Hz)。

【0067】実施例1

8-ヒドロキシ-7-(p-メトキシフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジーン-1,4(2H,3H)ジオン(L-003)

シス-3,6-エポキシ-3-メトキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-2-(p-メトキシフェニル)3,4,5,6-テトラヒドロピリジン(エキソ体)1.0gにヒドラジーン-水混合物10mlを加え、窒素気流下100℃で1時間加熱した。氷冷下、反応液に水を加え酢酸で中和しpH3とした。析出した黄色粉末状結晶をろ取した。ついで1N水酸化ナトリウムに溶かしLH-20で精製後、凍結乾燥した。収量190mg(18.4%)。

NMR(DMSO-d₆) δ: 3.80(3H, s)、6.96(2H, d, J=9.0Hz)、8.33(1H, s)、8.45(2H, d, J=9.0Hz)。

IR(KBr) ν: 1660、1610、1585、1365、1255cm⁻¹...

元素分析:計算値(C₁₄H₁₀N₃O₄Na·3H₂O)C:46.54; H:4.46; N:11.63。測定値C:46.75; H:4.40; N:11.64。

【0068】参考例22

N-Boc-4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニルグリシンメチルエステル

N-Boc-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル2.8gと無水炭酸カリウム1.38g(1.0eq)を無水DMF10mlに加え、次いでN-(3-ブロモプロピル)フタルイミド2.68g(1.0eq)を加え、100℃で1時間加熱した。反応液を氷水にあげ酢酸エチルで抽出、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。シリカゲルカラム(溶出:5%酢酸エチル-ジクロロメタン)を用いて精製した。無色結晶を得た。収量3.88g(82.6%)。

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 1.43(9H, s)、2.18(2H, m)、3.71(3H, s)、3.91(2H, t, J=6.8Hz)、4.02(2H, t, J=6.0Hz)、5.23(1H, d, J=6.3Hz)、5.46(1H, d, J=6.3Hz)、6.78(2H, d, J=8.8Hz)、7.23(2H, d, J=8.8Hz)、7.73(2H, m)、7.85(2H, m)。

【0069】参考例23

N-ホルミル-4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニルグリシンメチルエステル

N-Boc-4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニルグリシンメチルエステル3.0gに、ギ酸25mlを加え、40-50℃で30分間撹拌した。次いで、氷冷下無水酢酸1.27ml(2.1eq)を滴下し、一晚撹拌した。無水酢酸1mlを追加し、40-50℃で2時間撹拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウム水で中和し酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。生じた無色結晶をn-ヘキサンを用いてろ取した。収量2.43g(95.7%)。

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 2.18(2H, m)、3.74(3H, s)、3.90(2H, t, J=6.9Hz)、4.01(2H, t, J=6.0Hz)、5.57(1H, d, J=7.4Hz)、5.58(1H, d, J=7.4Hz)、6.78(2H, d, J=8.8Hz)、7.23(2H, d, J=8.8Hz)、7.71(2H, m)、7.85(2H, m)、8.21(1H, s)。

【0070】参考例24

5-メトキシ-4-[4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニル]オキサゾール

ハイフロッサーセル(登録商標)0.75g、五酸化リン1.5gをジクロロエタン15ml中で50-60℃に加熱し、激しく撹拌した。ジクロロエタン20mlに溶かしたN-ホルミル-4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニルグリシンメチルエステル2.0gを滴下した。一晚撹拌した。氷冷下飽和炭酸水素ナトリウム水を用いて中和しハイフロッサーセル(登録商標)を用いてろ過後分液した。水層をジクロロメタンで抽出し、有機層を合わせて水洗、乾燥後、溶媒を留去した。析出した結晶を酢酸エチル-n-ヘキサンを用いてろ取した。収量0.8

8g(46.1%),

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 2.20(2H, m)、3.93(2H, t, J=7.0Hz)、4.05(3H, s)、4.06(2H, t, J=6.0Hz)、6.84(2H, d, J=8.8Hz)、7.47(1H, s)、7.69(2H, d, J=8.8Hz)、7.70(2H, m)、7.86(2H, m)。

【0071】参考例25

シス-3,6-エポキシ-3-メトキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-2-[4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニル]-3,4,5,6-テトラヒドロピリジン

5-メトキシ-4-[4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニル]オキサゾール120mgにマレイン酸ジメチル0.5g(10eq)を加え120℃、3時間加熱した。残渣をシリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル-ヘキサン1:2)を用いて精製した。エキソ付加体:収量75mg(45.4%)。

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 2.23(2H, m)、3.05(1H, s)、3.06(1H, s)、3.50(3H, s)、3.73(3H, s)、3.77(3H, s)、3.93(2H, t, J=6.0Hz)、4.10(2H, t, J=6.0Hz)、6.25(1H, s)、6.87(2H, d, J=8.8Hz)、7.73(2H, m)、7.88(2H, m)、7.91(2H, d, J=8.8Hz)。

エンド付加体:収量59mg(35.7%)。

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 2.23(2H, m)、3.46(3H, s)、3.56(3H, s)、3.63(3H, s)、3.80(2H, m)、3.92(2H, t, J=6.6Hz)、4.10(2H, t, J=6.6Hz)、5.98(1H, d, J=3.8Hz)、6.81(2H, d, J=9.2Hz)、7.74(2H, m)、7.83(2H, m)、7.98(2H, d, J=9.0Hz)。

【0072】実施例2

7-[4-(3-アミノプロピルオキシ)フェニル]-8-ヒドロキシピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-011)

シス-3,6-エポキシ-4,5-ジメトキシカルボニル-3-メトキシ-2-[4-(3-フタルイミドプロピルオキシ)フェニル]-3,4,5,6-テトラヒドロピリジン エキソ体0.57gおよびエンド体0.5gの混合物にヒドラジン-水和物1.5mlを加え、窒素気流下100℃、4時間加熱撹拌した。塩酸を用いて中和し、pH5としてろ取した。1N水酸化ナトリウムに溶解しAmbertlite(登録商標)XAD-2(Rohm & Haas社)カラム(15φ×200)に付した。1N塩酸で溶出する画分を集め溶媒を留去し得られた粉末状結晶をメタノールを用いてろ取した。収量:76mg。融点300℃以上。

NMR(DMSO-d₆) δ(ppm): 2.08(2H, m)、2.98(2H, m)、4.16(2H, m)、7.08(2H, d, J=9.0Hz)、8.05(3H, br.)、8.20(2H,

d, J=9.0Hz)、8.74(1H, s)。

IR(KBr) ν: 3450、2980、2870、1660、1600、1475、1350、1295、1280cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₆H₁₆N₄O₄·2HCl) C: 47.89; H: 4.52; N: 13.96。測定値 C: 47.59; H: 4.60; N: 13.96。

【0073】実施例3

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-012)

参考例19で得た3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン55mgにヒドラジン1水和物1mlを加え100℃、25分間、窒素気流下加熱した。氷冷下、反応液に水を加え、塩酸で中和、pH5とし、生じた黄色粉末状結晶をろ取した。収量20mg(43.9%)。融点300℃以上。

NMR(DMSO-d₆) δ(ppm): 6.29(2H, s)、7.51-7.69(5H, m)。IR(KBr) ν: 3470、3050、1645、1585cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₃H₉N₄O₂Cl) C: 54.09; H: 3.14; N: 19.41。測定値 C: 54.18; H: 3.07; N: 19.61。

【0074】参考例26

3,4-ジメトキシカルボニル-2-メトキシ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

参考例18で得た2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン1.2gをメタノール25mlに溶かし、1Nナトリウムメトキシドメタノール溶液6.34ml(2.0eq)を加え、室温で30分間撹拌した。酢酸0.2ml(1.1eq)で中和し溶媒を留去した。残渣に水を加え酢酸エチルで抽出、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル)を用いて精製、析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。収量 1.1g(85.2%)。

NMR(CDCl₃) δ(ppm): 3.92(3H, s)、3.93(3H, s)、4.11(3H, s)、7.49(3H, m)、7.58(2H, m)。

【0075】参考例27

3-アミノ-4,5-ジメトキシカルボニル-6-メトキシ-2-フェニルピリジン

3,4-ジメトキシカルボニル-2-メトキシ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン1.0gを酢酸エチル10mlに溶かし、10%Pd-C(50%湿潤)500mgを加え、室温で3.5時間接触還元した。触媒をろ去後、乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。収量 0.8g(87.6%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 3.90(3H, s)、3.93(6H, s)、5.18(2H, br.)、7.49(3H, m)、7.68(2H, m)。

【0076】実施例4

8-アミノ-5-メトキシ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-013) 3-アミノ-4,5-ジメトキシカルボニル-6-メトキシ-2-フェニルピリジン0.8gにヒドラジン1水和物4mlを加え、100℃、1時間、窒素気流下加熱した。氷冷下、反応液に水を加え、塩酸で中和、pH3とし、生じた黄色粉末状結晶をろ取した。収量 0.7g(98.7%)、融点250-251℃(分解)。

NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 3.89(3H, s)、7.47(3H, m)、7.81(2H, dd、J=1.6、8.4 Hz)。

IR(KBr) ν: 3450、1645、1530 cm⁻¹。

元素分析: 計算値(C₁₄H₁₂N₄O₃) C: 59.15; H: 4.25; N: 19.71; 測定値 C: 59.11; H: 4.13; N: 19.49。

【0077】実施例5

マイクロペルオキシダーゼ触媒による発光強度の比較

参考例5、12、実施例1、2、3および4で得られたピリドピリダジン誘導体およびルミノール(5%水酸化ナトリウム水溶液から再結晶化)それぞれを100pgおよび100ng/mlになるように75mMバルビタール緩衝液(pH8.6)で溶解した。それぞれ100μlを試験管に取り、マイクロペルオキシダーゼ5μg/ml(75mMバルビタール緩衝液pH8.6)100μlを加えさらに蒸留水で希釈した30mM H₂O₂液100μlを加えて化学発光反応を開始させた。測定装置にはアロカ製ルミネッセンスリーダーRLR-201を用い30秒間の化学発光量を計測した。10pg/管および10ng/管におけるルミノール(Na塩)の発光量をそれぞれ100として各種ピリドピリダジン誘導体の相対発光強度を算出した。結果を第1表にまとめる。第1表に示すごとく、ルミノール(Na塩)を100として比較して、最大約55倍の発光強度を与える。

【0078】

【表1】

各種ピリドピリダジン誘導体の相対発光強度

(略名)	10pg/管	10ng/管
参考例5(L-002)	5541	1901
12(L-010)	124	48
実施例1(L-003)	3740	1487
2(L-011)	3533	1051
3(L-012)	102	40
4(L-013)	34	21
対照		
ルミノール(Na塩)	100	100

【0079】実施例6

ペルオキシダーゼ触媒による発光強度の比較1

参考例12ならびに実施例3および4で得られたピリドピリダジン誘導体およびルミノールそれぞれを、0.2mM濃度になるように0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)を含む0.2Mトリス緩衝液pH8.6に溶解した。それぞれ50μlを試験管に取り、西洋ワサビペルオキシダーゼの1ngおよび10ng/mlの濃度の0.2Mトリス緩衝液(pH8.6)100μlを加え、

さらに0.6mMH₂O₂を含む0.2Mトリス緩衝液(pH8.6)50μlを加えて化学発光反応を開始させた。測定はH₂O₂液添加後60秒から70秒までの10秒間の発光量を計測した。測定結果を第2表にまとめた。第2表に示すごとく、ルミノール(Na塩)と比べて最大約10倍の高い発光量を与えた。

【0080】

【表2】

ペルオキシダーゼ触媒によるピリドピリ
ダジン誘導体の発光量(エンハンサーを
用いない場合)

西洋ワサビ ペルオキシダー ゼ ng/管	参考例12 (L-010)	実施例3 (L-012)	実施例4 (L-013)	対照 (ルミノール Na塩)
0.1	1.878	2.388	0.182	0.204
1	2.343	4.990	1.214	0.526

単位 キロカウント

【0081】実施例7

ペルオキシダーゼ触媒による発光強度の比較2

実施例3で得られたピリドピリダジン誘導体(L-012)およびルミノールそれぞれを0.2mM濃度になるように0.1mM EDTAを含む0.2Mトリス緩衝液(pH 8.6)に溶解した。それぞれ990 μ lを試験管に取り、化学発光増強剤(エンハンサー)として40mM p-ヨードフェノールのジメチルスルホキシド(DMSO)溶液10 μ lを加えて混合した後、50 μ lをそれぞれ別の試験管に分取し、西洋ワサビペルオキシダーゼの10pg、100pg、1ng、10ng/mlの濃度の0.2Mトリス

緩衝液(pH 8.6)100 μ lを加えた。さらに0.6mM H₂O₂を含むトリス緩衝液(pH 8.6)50 μ lを加えて化学発光反応を開始した。測定はH₂O₂液添加後60秒から70秒までの10秒間の発光量を計測した。測定結果を第3表にまとめる。第3表に示すごとく、実施例3のピリドピリダジン誘導体(L-012)はルミノールと比べて約4~20倍の化学発光量を与える。L-012のナトリウム塩もL-012と同様の化学発光量を与えた。

【0082】

【表3】

ペルオキシダーゼ触媒によるピリドピリ
ダジン誘導体の発光量(エンハンサー添
加)

西洋ワサビ ペルオキシダーゼ pg/管	実施例3 (L-012)	対 照 (ルミノールNa塩)
1	0.678	0.032
10	3.128	0.295
100	115.638	28.288
1000	1184.635	294.160

単位 キロカウント

【0083】実施例8

実施例2で得られたピリドピリダジン誘導体(L-01

1) 5マイクロモルをジメチルホルムアミド(DMF)0.5mlに溶解した。無水こはく酸7.5マイクロモルを含

むDMF溶液0.1mlを加えて4℃で一夜反応させた。次に5マイクロモルのN-ヒドロキシスクシンイミドを含むDMF溶液0.1ml、8.5マイクロモルのジシクロヘキシルカルボジイミドを含むDMF溶液0.1mlを加えて更に一夜反応させて、L-011の活性エステル体とした。次にインターフェロン γ (IFN- γ)に対する単クローン抗体を0.05Mホウ酸緩衝液(pH8)中に2.15mg/mlの濃度となるように調製した。この抗体溶液500 μ lにL-011:抗体の比が20:1となるように前記の活性エステル溶液を添加し、4℃で一晩反応させた。生成したL-011-モノクローナル抗IFN- γ 抗体コンジュゲートは、セファデックス(登録商標)G-25ファインを用いたゲル濾過[カラム容量10ml、0.05Mホウ酸緩衝液(pH8)で平衡化]で精製した。

【0084】調製したコンジュゲートを用いたイムノアッセイは、ポリスチレン製ビーズ(イムノケミカル社製 直径3mm)を固相として行った。ビーズを生理的リン酸緩衝溶液(PBS)で溶解した50 μ g/ml IFN- γ 溶液中に浸し、4℃で一晩インキュベートした。ビーズをPBSで3回洗った後、25%ブロッカー(登録商標)(雪印乳業製)を含むPBSに浸し、4℃で使用時まで保存した。L-011-モノクローナル抗IFN- γ コンジュゲートを10 μ g/ml~10pg/mlとなるように25%ブロッカーを含むPBSで段階的に希釈し、コンジュゲート溶液を調製した。各溶液250 μ l中にビーズを1個添加し、振盪しながら室温で2時間インキュベートした。ビーズをPBSで5回洗った後、250 μ lの2N水酸化ナトリウム溶液に浸し、100℃で1時間インキュベートすることによりL-011を抗体分子上から遊離させた。遊離したL-011を含む上清を100 μ l用い、化学発光法によりL-011量を定量した。すなわち、5 μ g/mlマイクローペルオキシダーゼ(MP-11)を含む75mMバルビダール緩衝液(pH8.6)100 μ lおよび30mM過酸化水素を含む75mMバルビタール緩衝液100 μ lを加えて発光を開始させ、ルミネッセンスリーダーRLR-201(Aloka社製)で計測した(30秒間測光)。結果を第1図に示す。第1図のごとく、抗体量の増加と共に発光カウントが増大する。

【0085】実施例9

化学発光検出法を用いるサンドイッチ酵素免疫測定法ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(hbFGF)の測定を行った。使用したモノクローナル抗体(3H3)は後記参考例28の方法で得たものである。

1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗体の調製
hbFGFに対するモノクローナル抗体(3H3)7mg/mlを0.1M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)に対して4℃で20時間透析し、ペプシン(シグマ社製、米国)(0.1mg)を加え、37℃で8時間消化した。

1Mトリス(Tris)でpHを8にして反応を止め、ウルトロゲル(Ultrogel)AcA44(IBF社製、フランス)のカラムで0.15M NaClを含む0.02Mホウ酸緩衝液(pH8.0)を溶出液として分離し、F(ab')₂を得た。

【0086】これを、1mlに濃縮後、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)に対して4℃で20時間透析し、0.2Mメルカプトエチルアミン、5mM EDTA、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)0.1mlを加えて、37℃、90分間還元した。反応液をセファデックス(Sephadex)(登録商標)G-25 fine(ファルマシア・ファインケミカル社製、スウェーデン)(ϕ 1 \times 60cm)で5mM EDTA、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)を溶出液として分離し、Fab'画分を得た。一方、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(ベーリンガー・マンハイム社製、西ドイツ)10mgを1.5mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶かし、N-(γ -マレイミドブチルオキシ)サクシンイミド(GMBS)3.5mgをN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)100 μ lに溶かして加え、30℃で60分間攪拌後、セファデックス(登録商標)G-25 fine(ϕ 1.2 \times 60cm)で0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を溶出液として分離し、マレイミド基の導入されたHRPを得た(マレイミド化HRP)。Fab'とマレイミド化HRPをモル比で1:1となるように混ぜ、4℃で20時間反応した。反応液を、ウルトロゲルAcA44のカラムで0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を溶出液として分離し、酵素標識抗体(3H3-HRP)を得た。

【0087】2) 抗体結合固相の調製

hbFGFに対するモノクローナル抗体(MAb52およびMAb98)を0.1M炭酸緩衝液(pH9.5)で50 μ g/mlになるように希釈し、直径3.2mmのポリスチレン球を浸漬して4℃で一晩放置して感作させた。0.15M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0;PBS)で洗浄し、0.1%BSAを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で用時まで冷所保存した。

【0088】3) サンドイッチ法-EIA(化学発光法)

前記2)で調製したポリスチレン球を試験管に取り、25%ブロッカー(大日本製薬)、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液(緩衝液B)に溶解した各種濃度のhbFGF250 μ lを加えて4℃で一晩反応させた。PBSで2回洗浄後、前記1)で調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗体(緩衝液Bで150倍に希釈)250 μ lを加えて室温で3時間反応させた。PBSで2回洗浄し、実施例3で得られたピリダジン誘導体(L-012)200 μ M、EDTAを50 μ M化学発光増強剤として4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾールを100 μ Mの割合で含む50mMトリス緩衝液(pH7.5)100 μ l、300 μ M過酸化水素液100 μ l、5%DMSOを加えて化学発光反応を生じせしめた。測定にはアロカルミネッセンスリーダ

ーを利用し、過酸化水素液添加後60秒から70秒までの10秒間の化学発光量を計測した。得られたhbFGFの標準曲線を第2図に示す。この結果からhbFGFを約2pg/mlまで測定できる。

【0089】参考例28

免疫

BALB/cマウス(♀8週令)に対し、フロインド完全アジュバント(Difco社製)に溶解させた50μgの抗原ヒトrhbFGFムテインCS23(ヒトbFGF中70位および88位のCysがSerで置換されているムテイン)を腹腔に注射した。2週間後に、フロインド完全アジュバント0.4mlに溶かした50μgの抗原rhbFGFムテインCS23を腹腔に再投与した。さらに2週間後にフロインド不完全アジュバント0.4mlに溶かした50μgの抗原rhbFGFムテインCS23の追加免疫を行い、その2週間後に生理食塩水に溶かした50μgのヒトbFGFムテインCS23をマウス尾静脈内に接種した。

【0090】細胞融合

前記の免疫マウスより、抗原最終投与の3日後脾臓を摘出し、細胞融合に用いる細胞を得た。この細胞は、イスコフ培地とハムF-12培地を1:1の比率で混合した培地(以下IH培地と略す)に懸濁した。マウス骨髓腫様細胞SR2/O-Ag14は、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で5%炭酸ガス、95%空気の下で継代培養した。細胞融合は、ケーラーおよびミルスタインらが確立した方法[ケーラー, G. およびミルスタイン, C.:ネイチャー(Nature) 256, 495(1975)]に準じて行った。このミエローマ細胞 2×10^7 個と前記した方法で得られた免疫されたリンパ球 1.5×10^8 個を混合、遠沈し、1mlのIH培地に溶解した45%ポリエチレングリコール6000(以下PEG6000)を滴下した。PEG6000溶液は、予め37℃に温め、ゆっくりと1分間かけて滴下した。

【0091】次にIH培地1mlを1分間、1mlを1分間、8mlを3分間かけて滴下した。その後室温で1,000回転5分間遠心し上清を除去した。この細胞沈澱物を20%仔牛血清を含むIH培地30mlに懸濁し、96穴マイクロプレート(ヌンク社)に100μlずつ植えた。1日後、HAT(ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} M)を含んだIH培地(20%仔牛血清含有)(以下HAT培地と称する。)を各ウェルに100μlずつ添加し、さらに3日おきに、培地の1/2量をHAT培地と交換した。このようにして生育した細胞は雑種細胞である。

【0092】抗体産生細胞の検索

200ng/mlのrhbFGFムテインCS23を含む固定

緩衝液(0.1M炭酸水素ナトリウム(pH9.6)、0.02%アジ化ナトリウム)をポリスチレン製96穴マイクロプレート(ヌンク社)に100μl/穴加えた。2時間後、洗浄液(0.05%ツイーン20、生理的リン酸緩衝液)で洗った後、培養上清50μlと希釈用緩衝液[0.05Mトリス・塩酸(pH8.01、1mM塩化マグネシウム、0.15M塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20、0.02%アジ化ナトリウム、0.3%ゼラチン)]50μlを混合した溶液100μlをマイクロプレートに加えた。2時間後培養上清を洗浄液で洗った後、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体(バイオラッド社)を加えた。2時間後2次抗体を洗浄液で洗った後、反応基質を加えた呈色反応を行った(ELISA法)。この方法により4つのウェルにrhbFGFムテインCS23結合活性が認められた。

【0093】bFGF中和抗体産生細胞の検索

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を2.5%牛胎児血清を含むGIT培養液に懸濁し、96穴マイクロプレートに2,000個/穴で100μl播種した。翌日種々の濃度のハイブリドーマ培養上清、4ng/ml rhbFGF、2.5%牛胎児血清を含むGIT培養液100μl/穴添加し3日間37℃、5%CO₂、7%O₂下で培養した。3日後培養液を除去した後1mg/mlMTT(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2-H-テトラゾリウムブロマイド)を含む2.5%牛胎児血清を含むGIT培養液100μl/穴加えた。4時間、37℃、5%CO₂、7%O₂下で培養した後、10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を100μl/穴加えた。4時間後、OD590nmの吸光度を96穴用分光光度計(タイターテック社)で測定した(MTT法)。この方法により1つのウェルに強い中和活性が観察された。

【0094】雑種細胞のクローニング

このウェル中の細胞を、1ウェルあたり0.5個となるように、予めマウス胸腺細胞を栄養細胞としてまいておいた96穴マイクロタイタープレートにまき、クローニングを行った。その結果、ハイブリドーママウス3H3細胞を得た。クローニングされた細胞は、10%仔牛血清を含むIH培地に10%となるようジメチルスルホキシド(DMSO)を加え液体窒素内に貯蔵した。

【0095】モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス

前記で得られた3H3細胞の培養上清を、マウス抗体サブクラス検出キット(バイオラッド社)により各種標品免疫グロブリンと反応させた。その結果を第4表に示す。

【0096】

【表4】

標品免疫グロブリン	3H3抗体
IgG ₁	+
IgG _{2a}	—
IgG _{2b}	—
IgG ₃	—
IgM	—
IgA	—

表中、+は反応陽性を、—は反応陰性を示す。

【0097】表中、+は反応陽性を、—は反応陰性を示す。第4表より、3H3細胞培養上清中の抗体は免疫グロブリンクラスIgG₁サブクラスに属する。

【0098】培養上清、腹水からのモノクローナル抗体の精製
結合緩衝液(3M塩化ナトリウム、1.5Hグリシン(pH 8.7))で平衡化したプロテインAカラムに、マウス3H3細胞の培養上清と結合緩衝液を1:1で混合したものを添着した。結合緩衝液で洗った後、溶出緩衝液(0.1Mクエン酸(pH 5))で溶出した。溶出液には1Mトリス(pH 8.0)を加え中性化して生理的リン酸緩衝液中で透析した。標品のIgG量定量は実施例2(2)の方法に従って以下の様に行った。濃度のわかっているマウスIgGおよび3H3抗体を様々な希釈倍率で固定緩衝液でポリスチレン製96穴マイクロプレートに固定した。2時間後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体(パイオラッド社)を加えた。2時間後反応基質を加えた呈色反応を行った(ELISA法)。濃度のわかっているマウスIgG₁について定量曲線を描き、それに対して標品のIgG量を定量した。これにより3H3抗体60μg/mlの溶液を調製した。1μg/mlのウサギ抗bFGFポリクローナル抗体を固定し、rhbFGFムテインCS23を添加した後1μg/mlの3H3抗体を添加し、1μg/mlのアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体を添加した。この方法により、3ng/mlまでのrhbFGFムテインCS23の検出が可能である。さらに腹水からのモノクローナル抗体の精製を行った。

【0099】マウス3H3細胞株を、マウス(Balb/c)にて腹水化した。腹水からのIgGの精製は、常法に従った。すなわち、腹水5mlを45%飽和の硫酸アンモニウムにて塩析し、沈澱を0.15M NaClを含むホウ酸緩衝液(BBS、pH 8.5)に溶解し、BBSに対して4℃で20時間透析した。これを、DE-50(英国、Whatman社製、1×60cm)カラムに付し、0.1Mリン酸緩衝液(pH 8.0)中のNaCl濃度を0.1Mから0.35Mに直線的に変化させる濃度勾配溶出法により、腹水5mlからモノクローナル抗体3H3抗体を7mg得た。なお、前記で得られたハイブリドーママウス3H3細胞は、平成元年11月10日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50216として寄託されており、さらにこの細胞は通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に、平成元年11月14日から受託番号FERMBP-2658として寄託されている。

【0100】rhbFGFムテインCS23は、形質転換体エシエリヒア・コリ(Escherichiacoli)MM294/pTB762(IFO 14613, FERM BP-1645)を用いて、セノ(Seno)ら、バイオフィジカル・バイオケミカル・リサーチ・コミュニケーション(Biophys. Biochem. Res. Commun.) 151, 701(1988)、ヨーロッパ特許出願公開第281,822号公報に記載の方法で製造されたものを用いた。前記エシエリヒア・コリMM294/pTB762は1987年5月27日からIFOに受託番号IFO 14613として寄託されており、また本形質転換体はFRIに1987年6月11日から受託番号FERM P-9409として寄託され、該寄託はブダペスト条約に基づく寄託に切り換えられて、受託番号FERM BP-1645としてFRIに保管されている。

【0101】参考例29
3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-6-ヒドロキシ-2-フェニルピリジン
参考例17で得られた3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン 500mg、還元鉄690mg、エタノール5mlを60℃に加温し濃塩酸2.83mlを30分間で滴下した。氷冷下飽和炭酸水

素ナトリウム水を用いて中和しジクロロメタンで抽出した。有機層を乾燥後、溶媒を留去した。シリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル-ジクロロメタン1:6)を用いて精製し、粗結晶を得た。ジクロロメタン-ヘキサンを用いて再結晶し橙色粉末状結晶を得た。

収量: 102mg(22.3%). mp 103-104°C. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.40(6H, m), 4.05(2H, s), 4.41(4H, m), 7.47(3H, m), 7.67(2H, m), IR(KBr) ν: 1740, 1720, 1635, 1580 cm⁻¹.

【0102】参考例30

3,4-ジエトキシカルボニル-2-ジメチルアミノ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

参考例18で得られた2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン100mgをエタノール1mlに溶かし、1.55Mジメチルアミンエタノール溶液0.34ml(2.0eq.)を加え、室温で撹拌した。1.5時間後ジメチルアミン溶液0.1mlを追加し、一晩放置した。溶媒を留去し、析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。

収量: 51.7mg(50.5%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37(6H, t, J=7.2Hz), 3.17(6H, s), 4.35(2H, q, J=7.2Hz), 4.40(2H, q, J=7.2Hz), 7.45(3H, m), 7.60(2H, m).

【0103】参考例31

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-6-ジメチルアミノ-2-フェニルピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-2-ジメチルアミノ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン52mgを酢酸エチル2mlに溶かし、10%Pd-C(50% wet)50mgを加え、5.5時間接触還元した。触媒をろ去後、溶媒を留去し、シリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン1:2)で精製した。

収量: 43mg(89.6%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37(3H, t, J=7.2Hz), 1.39(3H, t, J=7.2Hz), 2.80(6H, s), 4.36(4H, m), 5.08(2H, br.), 7.47(3H, m), 7.66(2H, m).

【0104】参考例32

3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-2-ピリドン

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチルピリジン2.52g(10mmole)を2%塩酸90mlに溶かし、亜硝酸ナトリウム0.83g(1.2eq)を水3mlに溶かして滴下した。室温で1時間撹拌し、一晩冷蔵した。析出した結晶をろ取した。酢酸エチルから再結晶し無色板状晶を得た。

収量: 1.5g(59.3%). 融点138-139°C. NMR(CDCl₃) δ: 1.36(6H, t, J=7.2Hz), 2.37(3H, s), 4.32(2H, q, J=7.2Hz), 4.36(2H, q, J=7.2Hz), 6.43(1H, s). IR(KBr) ν:

1755, 1725, 1635, 1260 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₂H₁₅NO₅) C: 56.91; H: 5.97; N: 5.53. 測定値 C: 56.96; H: 6.04; N: 5.39.

【0105】参考例33

3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-5-ニトロ-2-ピリドン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-2-ピリドン5.0gを無水酢酸13mlに懸濁し、-10°Cに冷却し発煙硝酸1.72ml(2.1eq)を30分間で滴下、そのまま30分間撹拌した。水40mlを加え室温で一晩撹拌した。生じた結晶をろ取、乾燥した。

収量: 2.19g(37.2%). ジクロロメタン-イソプロピルエーテルから再結晶し淡黄色プリズム晶を得た。

融点134-135°C. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.36(6H, t, J=7.2Hz), 2.72(3H, s), 4.38(4H, q, J=7.2Hz). IR(KBr) ν: 3420, 1755, 1650, 1525, 1350, 1270 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₂H₁₄N₂O₇) C: 48.33; H: 4.73; N: 9.39. 測定値 C: 48.41; H: 4.76; N: 9.36.

【0106】参考例34

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-5-ニトロピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-5-ニトロ-2-ピリドン1.0gに二塩化フェニルホスホン酸1.3ml(3.2eq.)を加え、170°C、20分間加熱した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムを用いて乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶出溶媒:酢酸エチル)で精製し油状生成物を得た。

収量: 360mg(34.0%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.34(3H, t, J=7.1Hz), 1.40(3H, t, J=7.1Hz), 2.68(3H, s), 4.41(4H, m). IR(KBr) ν: 2990, 1750, 1590, 1550 cm⁻¹.

【0107】参考例35

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-メチルピリジン

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-5-ニトロピリジン1.2gをエタノール15mlに溶かし、還元鉄1.9g(9eq.)を加え、塩酸7.1mlを滴下した。室温で30分間撹拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去し、油状生成物を得た。

収量: 1.1g. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.36(3H, t, J=7.0Hz), 1.40(3H, t, J=7.2Hz), 2.45(3H, s), 4.35(2H, q, J=7.2Hz), 4.40(2H, q, J=7.0Hz), 5.72(2H, br.). IR(neat) ν: 3500, 3000, 1740, 1710, 1255 cm⁻¹.

【0108】実施例10

8-アミノ-7-メチルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-023)

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-メチルピリジン57mgにヒドラジン-水混合物0.5mlを加え、窒素気流下、100℃、30分間加熱した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。

収量: 37mg(85.2%)。融点300℃以上。NMR(DMSO-d₆) δ(ppm): 2.43(3H, s), 7.16(2H, br.), 8.18(1H, s) IR(KBr) ν: 3430, 3350, 3240, 1655, 1590 cm⁻¹。元素分析: 計算値(C₈H₈N₄O₂·0.1H₂O) C: 49.54; H: 4.26; N: 28.88。測定値 C: 49.66; H: 4.11; N: 29.04。

【0109】参考例36

4-メトキシアセトフェノン

4-ヒドロキシアセトフェノン30.0gをエタノール200mlに溶かし、水60mlに溶かした水酸化ナトリウム11.3g(1.28eq.)とジメチル硫酸33.9g(1.22eq.)を交互に滴下した。30分間還流後、水10mlに溶かした水酸化ナトリウム2.8g(0.32eq.)を加え、3時間還流した。溶媒を留去後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。

収量: 26.1g(78.8%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 2.57(3H, s), 3.88(3H, s), 6.94(2H, d, J=9.0Hz), 7.95(2H, d, J=9.0Hz)。

【0110】参考例37

エチル3-(4-メトキシベンゾイル)ピルベートナトリウム4.2g(1.1eq.)をエタノール100mlに溶かし、還流しながら、4-メトキシアセトフェノン25.0gとしゅう酸ジエチル27ml(1.2eq.)の混合物を滴下した。2時間還流し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。1N塩酸200mlを加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。

収量: 34.7g(83.1%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 1.42(3H, t, J=7.1Hz), 3.90(3H, s), 4.40(2H, q, J=7.2Hz), 6.99(2H, d, J=9.0Hz), 7.04(1H, s), 8.00(2H, d, J=9.0Hz)。

【0111】参考例38

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)ピリジン

3-(4-メトキシベンゾイル)ピルビン酸エチル4.0gと3-アミノ-3-エトキシ-アクリル酸エチル5.34g(2.1eq.)を100℃で、減圧下、低沸点物を留去しながら1時間加熱した。10%塩酸25mlを加え、析

出した結晶をエタノールを用いてろ取した。炭酸水素ナトリウム水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。

収量: 2.7g(48.7%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 1.35(3H, t, J=7.1Hz), 1.39(3H, t, J=7.2Hz), 3.87(3H, s), 4.33(2H, q, J=7.0Hz), 4.38(2H, q, J=7.2Hz), 6.42(2H, br.), 6.97(2H, d, J=8.8Hz), 7.02(1H, s), 7.97(2H, d, J=9.0Hz)。IR(KBr) ν: 3470, 3350, 1725, 1695, 1600, 1565 cm⁻¹。

【0112】参考例39

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-2-ピリドン

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)ピリジン100mgに1N塩酸2ml、ジオキサン5mlを加え、氷冷下、亜硝酸ナトリウム26mg(1.3eq.)を水0.5mlに溶かして滴下した。室温で一晩攪拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウムで中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。析出した粗結晶をエタノールから再結晶した。

収量: 47mg(46.8%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 1.37(3H, t, J=7.2Hz), 1.39(3H, t, J=7.1Hz), 3.88(3H, s), 4.39(2H, q, J=7.2Hz), 4.41(2H, q, J=7.2Hz), 6.96(1H, s), 7.01(2H, d, J=9.0Hz), 7.81(2H, d, J=8.8Hz)。IR(KBr) ν: 1740, 1725, 1630, 1600, 1520, 1265, 1165 cm⁻¹。

【0113】参考例40

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-5-ニトロ-2(1H)ピリドン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-2(1H)ピリドン1.2gを無水酢酸8mlに懸濁し、-30℃に冷却、発煙硝酸0.36mlを滴下し、45分攪拌した。水を加え1時間攪拌した。あめ状生成物をろ取、ジエチルエーテルを用いて結晶化し洗浄した。収量: 0.62g(45.4%)。NMR(CDCl₃) δ(ppm): 1.37(6H, t, J=7.2Hz), 3.87(3H, s), 4.40(2H, q, J=7.2Hz), 4.42(2H, q, J=7.2Hz), 6.99(2H, d, J=8.8Hz), 7.52(2H, d, J=8.8Hz)。IR(KBr) ν: 1740, 1655, 1610, 1260 cm⁻¹。

【0114】参考例41

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-5-ニトロピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-5-ニトロ-2(1H)ピリドン300mgにオキシ塩化リン0.5mlを加え、DMF2滴を加え、100℃、1時間加熱した。氷水を加え、炭酸水素ナトリウム

で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル-ヘキサン1:1)で精製した。

収量: 270mg (86.0%)。NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.35 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.41 (3H, t, J = 7.2 Hz), 3.87 (3H, s), 4.39 (2H, q, J = 7.0 Hz), 4.46 (2H, q, J = 7.2 Hz), 6.98 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.8 Hz)。IR (neat) ν: 2970, 1750, 1610, 1575, 1540, 1260 cm⁻¹。

【0115】参考例42

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(4-メトキシフェニル)ピリジン
2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシフェニル)-5-ニトロピリジン280mgをエタノール4mlに溶かし、還元鉄340mg(8.9eq.)を加え、60℃に加熱、濃塩酸1.5mlを滴下し、還流させた。20分間加熱後、溶媒を留去、炭酸水素ナトリウム水で中和、酢酸エチルで抽出した。沈澱物をろ去後、有機層を得、水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。

収量: 213mg (82.4%)。NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.43 (3H, t, J = 7.2 Hz), 3.86 (3H, s), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.42 (2H, q, J = 7.2 Hz), 5.93 (2H, br.), 7.01 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.56 (2H, d, J = 8.8 Hz)。IR (neat) ν: 3480, 3360, 2980, 1735, 1700, 1605, 1515 cm⁻¹。

【0116】実施例11

8-アミノ-5-クロロ-7-(4-メトキシフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-024)

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(4-メトキシフェニル)ピリジン210mgにヒドラジン-水和物3mlを加え、窒素気流下、100℃、30分間加熱した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。

収量: 104mg (58%)。融点300℃以上。NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 3.83 (3H, s), 7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.36 (2H, br.), 7.64 (2H, d, J = 8.8 Hz)。IR (KBr) ν: 1645, 1605, 1495, 1250 cm⁻¹。元素分析: 計算値(C₁₄H₁₁N₄O₃Cl · 0.1 H₂O) C: 52.46; H: 3.52; N: 17.48。測定値 C: 52.23; H: 3.54; N: 17.68。

【0117】参考例43

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-メチルピリジン

参考例35で得た3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジ

エトキシカルボニル-2-メチルピリジン1.5g、トリエチルアミン1ml(2eq.)、酢酸エチル50mlを10% Pd-C(50% wet)1.5gを用いて、接触還元した。ろ過により触媒を除き、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル-ジクロロメタン1:1)で精製し標題化合物1.1gを油状生成物として得た。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.35 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.45 (3H, s), 4.34 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.98 (2H, br.), 8.16 (1H, s)。IR (neat) ν: 1720, 1615, 1415, 1305, 1275, 1240 cm⁻¹。

【0118】実施例12

8-アミノ-7-メチルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-26)

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-メチルピリジン57mgにヒドラジン-水和物0.5mlを加え、窒素気流下、100℃、30分間加熱した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。

収量: 37mg (85.2%)。mp 300℃以上。NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 2.43 (3H, s), 7.16 (2H, br.), 8.18 (1H, s)。IR (KBr) ν: 3430, 3350, 3240, 1655, 1590 cm⁻¹。元素分析: 計算値(C₈H₈N₄O₂ · 0.1 H₂O) C: 49.54; H: 4.26; N: 28.88。測定値 C: 49.66; H: 4.11; N: 29.04。

【0119】参考例44

4-メトキシエトキシメトキシアセトフェノン

4-ヒドロキシアセトフェノン16gをジクロロメタン160mlに溶かし、ジイソプロピルエチルアミン30.7ml(1.5eq.)を加え、MEMクロリド20.13ml(1.5eq.)を滴下した。室温で4時間攪拌後、水洗した。有機層を乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出:酢酸エチル-ヘキサン1:2)で精製した。

収量: 29.5g。NMR(CDCl₃) δ (ppm): 2.56 (3H, s), 3.37 (3H, s), 3.55 (2H, m), 3.83 (2H, m), 5.34 (2H, s), 7.10 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.94 (2H, d, J = 8.8 Hz)。

【0120】参考例45

エチル3-(4-メトキシエトキシメトキシ)ベンゾイルピルベート

ナトリウム3.2g(1.1eq.)をエタノール75mlに溶かし、4-メトキシエトキシメトキシアセトフェノン28.5gとしゅう酸ジエチル20.7ml(1.2eq.)の混合物を室温で30分で滴下し、1.5時間攪拌した溶媒を留去し、水を加え、塩酸で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、乾燥、溶媒を留去した。

収量: 38.7g(94%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.42(3H, t, J = 7.1 Hz), 3.37(3H, s), 3.55(2H, m), 3.83(2H, m), 4.40(2H, q, J = 7.2 Hz), 5.36(2H, s), 7.03(1H, s), 7.15(2H, d, J = 9.0 Hz), 7.98(2H, d, J = 9.0 Hz).

【0121】参考例46

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシエトキシメトキシフェニル)ピリジン
エチル3-(4-メトキシエトキシメトキシ)ベンゾイル
ピルベート38.7gとエチル3-アミノ-3-エトキシ
アクリレート39.9g(2.1eq.)を100℃で加熱攪拌
した。減圧下、低沸点物を留去しながら3時間加熱し
た。水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和
食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。残渣をシリカ
ゲルカラム(溶出: 酢酸エチル-ヘキサン1:3)で精製し
た。

収量: 32.2g(64.5%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.35(3H, t, J = 7.1 Hz), 1.39(3H, t, J = 7.1 Hz), 3.38(3H, s), 3.56(2H, m), 3.84(2H, m), 4.33(2H, q, J = 7.2 Hz), 4.38(2H, q, J = 7.2 Hz), 5.33(2H, s), 6.41(2H, br.), 7.02(1H, s), 7.12(2H, d, J = 9.0 Hz), 7.95(2H, d, J = 9.0 Hz).

【0122】参考例47

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシエト
キシメトキシフェニル)-2-ピリドン
2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-
メトキシエトキシメトキシフェニル)ピリジン32.3g
を1N塩酸250ml、ジオキサン100mlに溶かし、氷
冷下、亜硝酸ナトリウム6.9g(1.3eq.)を水30mlに
溶かして滴下し、1時間攪拌し、一晚冷蔵した。炭酸水
素ナトリウムで中和し、ジオキサンを留去後、酢酸エチ
ルで抽出した。有機層を和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒
を留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出: ジクロロメ
タン→酢酸エチル)で精製した。

収量: 18.1g(56%). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.38(3H, t, J = 7.1 Hz), 1.39(3H, t, J = 7.2 Hz), 3.39(3H, s), 3.58(2H, m), 3.84(2H, m), 4.39(2H, q, J = 7.1 Hz), 4.41(2H, q, J = 7.2 Hz), 5.33(2H, s), 6.96(1H, s), 7.30(2H, d, J = 9.0 Hz), 7.80(2H, d, J = 9.0 Hz). IR(KBr) ν: 2980, 2930, 1730, 1640, 1605, 1520, 1255, 1190 cm⁻¹.

【0123】参考例48

3,4-ジエトキシカルボニル-2-ヒドロキシ-6-(
4-メトキシエトキシメトキシフェニル)-5-ニトロ
ピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-メトキシエト
キシメトキシフェニル)-2-ピリドン1.0gを無水酢
酸3mlに溶かし、-20℃に冷却し、発煙硝酸0.2ml

を滴下し、1時間攪拌した。水を加え、室温で2時間攪
拌後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、炭酸水素ナ
トリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒
を留去した。析出した結晶をジエチルエーテルを用いて
ろ取した。

収量: 198mg(17.9%). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 1.22(2H, t, J = 7.1 Hz), 3.22(3H, s), 3.45(2H, m), 3.71(2H, m), 4.28(4H, m), 5.26(2H, s), 7.04(2H, d, J = 8.8 Hz), 7.25(2H, d, J = 8.8 Hz). IR(KBr) ν: 1770, 1720, 1570, 1230 cm⁻¹.

【0124】参考例49

3,4-ジエトキシカルボニル-2-ヒドロキシ-6-(
4-ヒドロキシフェニル)-5-ニトロピリジン
3,4-ジエトキシカルボニル-2-ヒドロキシ-6-(
4-メトキシエトキシメトキシフェニル)-5-ニトロ
ピリジン(粗精製物)2.2gをジクロロメタン30mlに溶
かし、氷冷下、四塩化チタン2.6mlを滴下、室温で1.
5時間攪拌した。水を加えた後、溶媒を留去し、酢酸エ
チルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後乾
燥、溶媒を留去した。ジエチルエーテルを用いて結晶化
しろ取した。

収量: 330mg. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.38(6H, t, J = 7.1 Hz), 4.41(4H, m), 6.90(2H, d, J = 8.8 Hz), 7.45(2H, d, J = 8.8 Hz). IR(KBr) ν: 1730, 1650, 1605, 1280 cm⁻¹.

【0125】参考例50

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-
ヒドロキシフェニル)-5-ニトロピリジン
3,4-ジエトキシカルボニル-2-ヒドロキシ-6-(
4-ヒドロキシフェニル)-5-ニトロピリジン130
mgをオキシ塩化リン2.5mlに懸濁し、DMF0.4mlを
加え、100℃、30分間加熱した。DMF0.4mlを
追加し、さらに30分間加熱した。溶媒を留去し氷水を加
え、炭酸水素ナトリウムで中和後、酢酸エチルで抽出
した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を
留去した。残渣をシリカゲルカラム(溶出: 酢酸エチル)
で精製した。

収量: 117mg(85%, 約20%0-ホルミル体混入). NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.34(3H, t, J = 7.2 Hz), 1.41(3H, t, J = 7.2 Hz), 4.38(2H, q, J = 7.2 Hz), 4.45(2H, q, J = 7.2 Hz), 6.92(2H, d, J = 8.6 Hz), 7.52(2H, d, J = 8.6 Hz).

【0126】参考例51

3-アミノ-6-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニ
ル-6-(4-ヒドロキシフェニル)ピリジン

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-
ヒドロキシフェニル)-5-ニトロピリジン800mgを
エタノール50mlに溶かし、還元鉄1.0g(8.8eq.)を

加え、60℃に加温、濃塩酸4mlを滴下し、還流させた。1.5時間後、還元鉄250mgと濃塩酸0.4mlを加え、3時間還流した。溶媒を留去、炭酸水素ナトリウム水で中和、酢酸エチルで抽出した。沈澱物をろ去後、有機層を得、水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。

収量: 530mg (71.7%). NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.43 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.37 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.43 (2H, q, J = 7.2 Hz), 5.92 (2H, br.), 6.92 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.48 (2H, d, J = 8.4 Hz). IR (neat) ν : 1735, 1700, 1605, 1590 cm⁻¹.

【0127】実施例13

8-アミノ-5-クロロ-7-(4-ヒドロキシフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジーン-1,4(2H,3H)ジオン(L-027)

3-アミノ-6-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-(4-ヒドロキシフェニル)ピリジン200mgにヒドラジーン水と物2mlを加え、窒素気流下、100℃、1時間加熱した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。メタノールに溶かしオクタデシルシリル化シリカゲルODSカラムで精製後、水を用いてろ取した。

収量: 128mg (86.7%). 融点 300℃以上。NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 6.90 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.53 (2H, d, J = 8.6 Hz), 9.84 (1H, s). IR (KBr) ν : 1650, 1610 cm⁻¹. 元素分析: 計算値 (C₁₃H₉N₄O₃Cl · 0.9H₂O) C: 48.66; H: 3.39; N: 17.46. 測定値 C: 48.89; H: 3.55; N: 17.23.

【0128】参考例52

2-プロモ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

参考例17で得た3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2(1H)ピリドン0.5gにホスホルルブロマイド7gを加え、100℃に加熱、DMF 0.5mlを滴下し15分間加熱した。氷水を加え、炭酸水素ナトリウムで中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。

収量: 0.54g (92%). NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.34 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.43 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.39 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.47 (2H, q, J = 7.2 Hz), 7.52 (5H, m). IR (neat) ν : 1740, 1570, 1540, 1255, 1220 cm⁻¹.

【0129】参考例53

3-アミノ-6-プロモ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン

2-プロモ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン550mgをエタノール25ml

に溶かし、還元鉄0.36g (5eq.)を加え、60℃に加温、酢酸1.5ml (16eq.)を滴下し、1時間還流した。溶媒を留去、炭酸水素ナトリウム水で中和、酢酸エチルで抽出した。沈澱物をろ去後、有機層を得、水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。シリカゲルカラム(溶出: 酢酸エチル)で精製した。

収量: 390mg (76%). NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.44 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.36 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.43 (2H, q, J = 7.2 Hz), 5.94 (2H, br.), 7.51 (5H, m). IR (KBr) ν : 1730, 1700, 1590, 1405, 1300, 1235 cm⁻¹.

【0130】実施例14

8-アミノ-5-プロモ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジーン-1,4(2H,3H)ジオン(L-035)

3-アミノ-6-プロモ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン90mgをエタノール1ml、ヒドラジーン水と物2mlに溶かし、室温で2時間攪拌した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。メタノールに溶かしシリカゲルにまぶし、シリカゲルカラム(溶出: 酢酸エチル→酢酸エチル-メタノール1:1)で精製後、水を用いてろ取した。

収量: 21mg (27%). 融点 286-288℃(dec.). NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 7.53 (3H, m), 7.67 (2H, m). IR (KBr) ν : 1645, 1585 cm⁻¹.

【0131】参考例54

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(4-ヒドロキシフェニル)ピリジン-0-リン酸ナトリウム塩

参考例51で得た3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(4-ヒドロキシフェニル)ピリジン100mgをトルエン4mlに懸濁し、ピリジン0.1g (5eq.)を加え溶解し、氷冷下、オキシ塩化リン2g (15eq.)を滴下した。室温で3時間攪拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウム水、酢酸エチル混合溶媒中で一晩攪拌した。水層Amberlite(登録商標)をXAD-2カラム、Sephadex(登録商標) LH-20カラム(溶出溶媒: 水)で精製した。メタノール、ジエチルエーテルを用いて結晶化した。

収量: 82mg (64%). H-NMR (D₂O) δ (ppm): 1.32 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz), 4.35 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.42 (2H, q, J = 7.1 Hz), 7.40 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.4 Hz). ¹³C-NMR (D₂O) δ (ppm): 16.00 (2C), 66.17, 66.56, 119.3, 123.71 (2C, J_{ccop} = 4.3 Hz, δ 7.40の¹Hと相関), 129.94, 131.62, 132.43 (2C), 134.80, 144.82, 152.94, 158.13 (J_{cop} = 5.5 Hz), 168.33, 170.81

IR (KBr.) ν : 1740, 1600, 1420, 1310, 1240, 1120, 990 cm^{-1} .

【0132】実施例15

8-アミノ-5-クロロ-7-(4-ヒドロキシフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオンO-リン酸ナトリウム塩(L-036)

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(4-ヒドロキシフェニル)ピリジンO-リン酸ナトリウム塩125mgにヒドラジン-水和物2mlに溶かし室温で45分間撹拌した。溶媒を留去し、炭酸水素ナトリウム22.5mg(1.0eq.)を加え、Sephadex(登録商標)LH-20(溶出溶媒:水)カラムで精製した。エタノールを用いてろ取した。

収量: 11mg(10%). NMR (D_2O) δ (ppm): 7.37(2H, d, $J=8.8\text{ Hz}$), 7.56(2H, d, $J=8.8\text{ Hz}$). IR (KBr.) ν : 1640, 1580, 1500 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_6\text{ClNaP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) C: 35.27; H: 2.96; N: 12.66; P: 7.00. 測定値 C: 35.19; H: 2.93; N: 12.86; P: 6.69.

【0133】参考例55

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

参考例18で得た2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン470mgをエタノール15mlに溶かし、8.7%アンモニア・エタノール溶液計6mlを加え、室温で4日間撹拌した。溶媒を留去し、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶をヘキサンを用いてろ取した。

収量: 405mg(91%). NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.37(3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 1.39(3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 4.38(2H, q, $J=7.2\text{ Hz}$), 4.40(2H, q, $J=7.2\text{ Hz}$), 7.48(5H, m).

【0134】参考例56

3,4-ジエトキシカルボニル-2-フルオロ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン100mgを酢酸2mlに溶かし、42%ほうフッ化水素酸1.5mlを加えた。-5℃に冷却し、水0.5mlに溶かした亜硝酸ナトリウム21mg(1.1eq)を滴下した。30分後、室温に戻し、炭酸水素ナトリウム水で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、乾燥、溶媒を留去した。析出した結晶(2-ピリドン体)をヘキサンを用いてろ取、洗浄し、ろ液を得た。ろ液の溶媒を留去し、油状物質を得た。

収量: 52mg(52%). NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.37(3H, t, $J=7.0\text{ Hz}$), 1.41(3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 4.43(2H, q, $J=7.2\text{ Hz}$), 4.45(2H, q, $J=7.0\text{ Hz}$), 7.51(5H, m).

【0135】参考例57

3-アミノ-6-フルオロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-2-フルオロ-5-ニトロ-6-フェニルピリジン160mgをエタノール5mlに溶かし、還元鉄120mg(5eq.)を加え、酢酸0.5ml(2.0eq.)を加え、30分間還流した。溶媒を留去、炭酸水素ナトリウム水で中和、酢酸エチルで抽出した。沈澱物をろ去後、有機層を得、水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去した。

収量: 142mg(96%). NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.38(3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$), 1.41(3H, t, $J=6.6\text{ Hz}$), 4.38(2H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 4.42(2H, q, $J=6.6\text{ Hz}$), 5.54(2H, br.), 7.50(3H, m), 7.64(2H, m).

【0136】実施例16

8-アミノ-5-フルオロ-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-037)

3-アミノ-6-フルオロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニルピリジン90mgをエタノール1mlに溶かし、ヒドラジン-水和物2mlを加え、室温で4時間撹拌した。溶媒を留去し、析出した結晶をエタノールを用いてろ取した。結晶に水を加え、1N塩酸で中和しろ取した。メタノールに溶かしシリカゲルにまぶし、シリカゲルカラム(溶出: 酢酸エチル→酢酸エチル-メタノール1:1)で精製後、水を用いてろ取した。

収量: 33mg(48%). NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7.10(2H, br.), 7.53(3H, m), 7.72(2H, m). IR (KBr.) ν : 1660, 1505, 1345, 1325 cm^{-1} .

【0137】参考例58

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)-2-ピリドン

参考例17で得た3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン0.72gを濃硫酸4.5mlに溶かし、氷冷撹拌下、発煙硝酸0.06mlを添加した。添加後室温で45分撹拌した後、氷水(約100ml)に注ぎ、析出沈澱物を濾取、水洗、乾燥して3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)-2-ピリドンの0.74gを淡黄色粉末として得た。

mp 188-190℃. NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.41(3H, t, $J=7.0\text{ Hz}$), 1.42(3H, t, $J=7.0\text{ Hz}$), 4.44(2H, q, $J=7.0\text{ Hz}$), 4.50(2H, q, $J=7.0\text{ Hz}$), 7.63(1H, t, $J=8.0\text{ Hz}$), 7.85(1H, dt, $J=1.5, 8.0\text{ Hz}$), 8.39(1H, m), 8.50(1H, t, $J=1.5\text{ Hz}$). IR (KBr.) ν : 1755, 1660, 1535, 1350, 1290, 1275, 1210, 1105, 1035, 850, 685 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_9$) C: 50.38; H: 3.73; N: 1

0.37. 測定値 C: 50.14; H: 3.74; N: 10.43.

【0138】参考例59

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)ピリジン
3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)-2-ピリドン0.70gをオキシ塩化リン2mlに懸濁し、氷冷下にDMF 0.3mlを加えた後、100℃で1時間かき混ぜた。反応液を氷水(100ml)にあげ、30分間かき混ぜたのち酢酸エチルで抽出、抽出液を重曹水、次いで食塩水で洗浄し乾燥(MgSO₄)した。溶媒を濃縮乾固後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:n-ヘキサン/酢酸エチル4:1)に付し、固形化する無色の残留物をエタノールから再結晶すると2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)ピリジンの0.51gが無色プリズム晶として得られた。

mp 90-91℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.36 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.44 (3H, t, J=7.0 Hz), 4.42 (2H, q, J=7.0 Hz), 4.49 (2H, q, J=7.0 Hz), 7.71 (1H, t, J=8.0 Hz), 7.89 (1H, dt, J=1.5, 8.0 Hz), 8.40 (1H, m), 8.53 (1H, t, J=1.5 Hz). IR(KBr) ν: 1750, 1740, 1550, 1535, 1350, 1260, 1235, 1020, 700 cm⁻¹.

【0139】参考例60

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(3-アミノフェニル)ピリジン
2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(3-ニトロフェニル)ピリジン0.37gおよび還元鉄0.45gをエタノール8mlに懸濁し60℃に加熱した。これに濃塩酸1.9mlを加え、還流下に30分間加熱した。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出し、重曹水、食塩水の順に洗浄し乾燥(MgSO₄)した。減圧下に濃縮後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/メタノール40:1)に付し3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(3-アミノフェニル)ピリジンの0.29gを黄橙色粘濁油状物として得た。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.36 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.42 (3H, t, J=7.0 Hz), 3.81 (2H, br. s), 4.36 (2H, q, J=7.0 Hz), 4.43 (2H, q, J=7.0 Hz), 5.98 (2H, br. s), 6.72 (1H, ddd, J=1.5, 2.0, 7.5 Hz), 6.83 (1H, dd, J=1.5, 2.0 Hz), 6.94 (1H, dd, J=1.5, 7.5 Hz), 7.24 (1H, t, J=7.5 Hz).

【0140】実施例17

8-アミノ-5-クロロ-7-(3-アミノフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-038)

3-アミノ-6-クロロ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-(3-アミノフェニル)ピリジン0.35gにヒドラジン-水合物7.5mlを加え、90℃で30分間かき混ぜた。反応液を氷水(約100ml)にあげ、酢酸を加えてpH6に調整し、析出する沈澱物を濾取水洗した。これをDMSO-H₂Oから再沈澱して8-アミノ-5-クロロ-7-(3-アミノフェニル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオンの0.23gを橙色粉末として得た。

mp 298℃(dec.). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 5.32 (2H, br. s), 6.65 (1H, dd, J=1.5, 7.5 Hz), 6.80 (1H, d, J=7.5 Hz), 6.85 (1H, s), 7.17 (1H, t, J=7.5 Hz), 7.29 (2H, br. s), 10.20-11.60 (2H, br.). IR(KBr) ν: 1650, 1585, 1410, 1325, 1125, 1075, 870, 810 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₃H₁₀N₅O₂Cl) C: 51.41; H: 3.32; N: 23.06. 測定値 C: 51.06; H: 3.47; N: 23.17.

【0141】参考例61

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン

2-アミノ-3,4-ジエトキシカルボニル-6-フェニルピリジン ヒドロクロリド(参考例15)21gを酢酸150mlに溶解し、室温下でかき混ぜながら発煙硝酸(d=1.58)18mlを滴下した。ついで100℃で2時間かき混ぜた。反応液を室温まで冷却し、300mlの水を加えたのち30分間氷冷した。析出結晶を濾取水洗後乾燥すると15gの3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドンが得られた。本化合物の物理定数は別途合成法(参考例17)で得られたものと一致した。

【0142】参考例62

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-ピリドン2.5gをオキシ塩化リン6.5mlに溶解し、DMF 1mlを加え100℃で30分間加熱した。反応液を減圧下に濃縮後、残留部に炭素水素ナトリウム水を加えて中和し酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン1:2)に付し、2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロフェニルピリジンの1.9gを黄色針状晶として得た。

mp 65-66℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.35 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.42 (3H, t, J=7.2 Hz), 4.44 (4H, q, J=7.2 Hz), 7.52 (5H, m). IR(KBr) ν: 2990, 1750, 1580, 1550 cm⁻¹.

【0143】参考例63

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-6-(イミダゾール-1-イル)-2-フェニルピリジン

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.379g、イミダゾール0.21g、クロロホルム15mlの混合物を8時間加熱還流した。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出し有機層を水、飽和食塩水で洗浄し硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去したのち残留部に酢酸5mlおよび還元鉄0.5gを加えて、室温で4時間かき混ぜた。反応液に炭酸水素ナトリウム水を加えて中和後、酢酸エチルで抽出した。容器装置を水、飽和食塩水で洗浄し硫酸ナトリウムで乾燥後、少量のシリカゲルを用いて濾過した。濾液を減圧下に濃縮すると3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-6-(イミダゾール-1-イル)-2-フェニルピリジンの0.342gが黄色油状物として得られた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.18 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.20 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.39 (2H, q, J = 7.2 Hz), 6.02 (2H, br. s), 7.12 (1H, s), 7.24 (1H, s), 7.40-7.75 (5H, m), 7.80 (1H, s).

【0144】実施例18

8-アミノ-5-(イミダゾール-1-イル)-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-039)

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-6-(イミダゾール-1-イル)-2-フェニルピリジン0.342gをエタノール10mlに溶解し、ヒドラジン-水和物0.5mlを加え7時間加熱還流した。反応液を濃縮後、残留部を酢酸酸性とし、析出沈澱物を濾取、水洗した。これをDMF-H₂Oから再沈澱すると8-アミノ-5-(イミダゾール-1-イル)-7-フェニルピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)-ジオンの0.2gが黄色粉末として得られた。

mp 320°C(dec.). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 6.93 (1H < s), 7.38 (1H, s), 7.40-7.80 (5H, m), 7.81 (1H, s), 11.20 (1H, br. s), 11.95 (1H, br. s). IR(KBr) ν: 1645, 1580, 1540, 1090 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₆H₁₂N₆O₂ · 0.2H₂O) C: 59.33; H: 3.86; N: 25.95. 測定値 C: 59.28; H: 3.84; N: 25.92.

【0145】参考例64

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジン

2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.379g, 1H-1,2,4-トリアゾール0.2g, ピリジン0.2ml, 1,2-ジクロロエタン15mlの混合物を80°Cで18時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出し、水、飽和食

塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: ジクロロメタン/酢酸エチル4:1)に付し3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジンの0.19gを黄色結晶として得た。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.33 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.37 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.42 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.44 (2H, q, J = 7.2 Hz), 7.44-7.70 (5H, m), 8.12 (1H, s), 9.12 (1H, s).

【0146】参考例65

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジン

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジン0.35gを酢酸エチル25mlに溶解し、10% Pd-C(50% wet)0.2gを加えた。この混合物を水素気流下室温で2.5時間攪拌した。触媒を濾去後、濾液を濃縮、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/酢酸エチル(4:1)で展開すると、3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジンの0.215gが得られた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.28 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.38 (3H, t, J = 7.2 Hz), 4.33 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.40 (2H, q, J = 7.2 Hz), 5.89 (2H, br. s), 7.40-7.70 (5H, m), 8.01 (1H, s), 8.77 (1H, s).

【0147】実施例19

8-アミノ-7-フェニル-5-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)-ジオン(L-040)

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリジン0.215gをエタノール15mlに溶解、ヒドラジン-水和物1mlを加え7時間加熱還流した。冷後、析出する黄色結晶を濾取、エタノールで洗浄した。この結晶を20mlの水に懸濁、酢酸1mlを加えて酸性としたのち、結晶を濾取水洗、乾燥すると8-アミノ-7-フェニル-5-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオンの0.11gが黄色結晶として得られた。

mp 290-292°C(dec.). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 7.40-8.10 (7H, m), 8.08 (1H, s), 8.74 (1H, s), 10.80-12.20 (2H, br.). IR(KBr) ν: 1650, 1660, 1590, 1510, 1310, 1290, 1130 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₅H₁₁N₇O₂) C: 55.52; H: 3.54; N: 31.08. 測定値 C: 55.48; H: 3.45; N: 31.28.

【0148】参考例66

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(テトラゾール-1-イル)ピリジン
2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン1.52g, 1H-テトラゾール0.84g, ジイソプロピルエチルアミン0.84mlおよび1,2-ジクロルエタン50mlの混合物を90℃で24時間反応させた。反応液に希塩酸を加えpH2としたのち、有機層を水、飽和食塩水の順に洗浄し硫酸ナトリウムで乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで溶出すると3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(テトラゾール-1-イル)ピリジンの0.36gが黄色結晶としてえられた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.31 (3H, t, J = 7.4 Hz), 1.38 (3H, t, J = 7.4 Hz), 4.43 (2H, q, J = 7.4 Hz), 4.47 (3H, t, J = 7.4 Hz), 7.45-7.85 (5H, m), 9.43 (1H, s)。

【0149】参考例67

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(テトラゾール-1-イル)ピリジン
3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(テトラゾール-1-イル)ピリジン0.36g, 10% Pd-C (50% wet) 0.3g, 酢酸エチル30mlの混合物を、水素気流中室温で2時間かき混ぜた。触媒を濾去後濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで溶出すると3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(テトラゾール-1-イル)ピリジンの0.172gが得られた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz), 4.33 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.41 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.12 (2H, br. s), 7.50-7.70 (5H, m), 9.14 (1H, s)。

【0150】実施例20

8-アミノ-7-フェニル-5-(テトラゾール-1-イル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオン(L-041)

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(テトラゾール-1-イル)ピリジン0.712gをエタノール2mlに溶解し、ヒドラジン-水和物1mlを加え90℃で2時間反応させた。エタノール15mlを加えて冷却、沈澱物を濾取しエタノールで洗浄した。これを20mlの温水に溶解し酢酸0.7mlを加えて冷却、析出沈澱物を濾取、水洗、乾燥すると8-アミノ-7-フェニル-5-(テトラゾール-1-イル)ピリド[3,4-d]ピリダジン-1,4(2H,3H)ジオンの0.11gが黄色結晶として得られた。

mp 190℃(dec.). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 7.

40-7.80(5H, m), 7.30-8.30(2H, br.), 9.71(1H, s), 10.80-12.40(2H, br.). IR(KBr) ν: 1650, 1590, 1560, 1510, 1300, 1090 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₄H₁₀N₈O₂ · 0.8H₂O) C: 49.94; H: 3.47; N: 33.28. 測定値 C: 50.07; H: 3.23; N: 33.27.

【0151】参考例68

3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(p-トリルスルホニル)ピリジン
2-クロロ-3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.379g, p-トルエンスルフィン酸ナトリウム・4水和物0.5gおよびエタノール15mlの混合物を3時間加熱還流した。濃縮後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去したのちシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、n-ヘキサン/酢酸エチル(4:1)で展開した。溶出液を濃縮後えられる結晶を同溶媒から再結晶すると3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(p-トリルスルホニル)ピリジンの0.289gが無色針状晶として得られた。

mp 115-117℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.34 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.48 (3H, t, J = 7.2 Hz), 2.46 (3H, s), 4.40 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.56 (2H, q, J = 7.2 Hz), 7.30-7.60 (5H, m), 7.34 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.98 (2H, d, J = 8.2 Hz). IR(KBr) ν: 1740, 1730, 1580, 1550, 1330, 1300, 1270, 1230, 1160, 1100, 1010 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₂₄H₂₂N₂O₈S) C: 57.83; H: 4.45; N: 5.62. 測定値 C: 57.77; H: 4.31; N: 5.42.

【0152】参考例69

3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(p-トリルスルホニル)ピリジン
3,4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-(p-トリルスルホニル)ピリジン0.35gをエタノール10mlに懸濁し、酢酸2ml、還元鉄0.15gを加え80℃で4.5時間かき混ぜた。エタノールを留去したのち、炭酸水素ナトリウム水で中和し酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/酢酸エチル(4:1)で展開すると、3-アミノ-4,5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-(p-トリルスルホニル)ピリジンの0.144gが得られた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.39 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.48 (3H, t, J = 7.2 Hz), 2.40 (3H, s), 4.37 (2H, q, J = 7.2 Hz), 4.53 (2H, q, J = 7.2 Hz), 6.50 (2H, s), 7.26 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.49 (5H, m), 7.94 (2H, q, J = 8.2 Hz).

【0153】実施例21

8-アミノ-7-フェニル-5-(p-トリルスホン
ニル)ピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H)ジ
オン(L-042)

3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-2-フェ
ニル-6-(p-トリルスホンニル)ピリジン0.251g
にヒドラジーン水和物2mlおよびエタノール2mlを加え
90℃で2時間かき混ぜた。エタノールを加えて冷却
後、析出沈澱物を濾取しエタノールで洗浄した。これを
30mlの水に懸濁し、酢酸2mlを加えて加温後、冷却し
て沈澱物を濾取、水洗、乾燥すると8-アミノ-7-フ
ェニル-5-(p-トリルスホンニル)ピリド[3, 4-d]
ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H)ジオンの0.15gが得ら
れた。

mp 310-314℃(dec.) NMR(DMSO-d₆) δ (p
pm): 2.47 (3H, s), 7.10-7.50 (5H, m), 7.4
2 (2H, d, J=8.4Hz), 7.70 (2H, d, J=8.4H
z), 12.00 (2H, br.). IR(KBr) ν: 1650, 15
80, 1315, 1140 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₂₀H
16N₄O₄S) C: 58.81; H: 3.95; N: 13.72. 測
定値C: 58.67; H: 4.08; N: 13.62

【0154】 参考例70

2-アミノ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニト
ロ-6-(4-ニトロフェニル)ピリジン

2-アミノ-3, 4-ジエトキシカルボニル-6-フェ
ニルピリジン(参考例15で得られる塩酸塩を中和した
もの)2.0gを濃硫酸12mlに溶解し、氷冷攪拌下に発
煙硝酸0.58mlを加えた。室温で1時間かき混ぜた
後、氷水(300ml)にあげ析出する沈澱物を濾取水洗
した。濾過残渣を酢酸エチルに溶解し、重曹水、食塩水
の順に洗浄し乾燥(MgSO₄)した。減圧下に濃縮後、残
留部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:
n-ヘキサン/酢酸エチル3:1)に付し2-アミノ-3,
4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-(4-ニ
トロフェニル)ピリジンの0.95gを黄色結晶として得
た。

mp 148-150℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.3
8 (3H, t, J=7.0Hz), 1.39 (3H, t, J=7.0H
z), 4.40 (2H, q, J=7.0Hz), 4.41 (2H, q, J
=7.0Hz), 7.62 (1H, s.), 6.50-7.50 (2
H, br.), 7.65 (2H, d, J=9.0Hz), 8.29 (2H,
d, J=9.0Hz). IR(KBr) ν: 1750, 1710, 1
600, 1565, 1525, 1440, 1350, 133
0, 1300, 1265, 1235, 1110, 1020, 7
05 cm⁻¹. 元素分析: 計算値(C₁₇H₁₆N₄O₈) C: 50.5
0; H: 3.99; N: 13.86. 測定値C: 50.29; H:
3.76; N: 13.82.

【0155】 参考例71

2-クロロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニト
ロ-6-(4-ニトロフェニル)ピリジン

2-アミノ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニト

ロ-6-(4-ニトロフェニル)ピリジン3.1gを酢酸2
0mlに懸濁し、氷冷攪拌下に発煙硝酸3mlを加えたの
ち、110℃で3時間反応させた。反応液を氷水(30
0ml)にあげ、析出物を濾取水洗後酢酸エチルに溶解
し、重曹水、食塩水で洗浄、乾燥(MgSO₄)した。溶媒
を減圧下に留去し3, 4-ジエトキシカルボニル-5-
ニトロ-6-(4-ニトロフェニル)-2-ピリドンの
2.94gを黄橙色粉末として得た。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.30-1.50 (6H, m),
4.30-4.50 (4H, m), 7.50-7.60 (2H, b
r.) 8.15-8.25 (2H, br.).

上記で得た粗生成物2.90gをオキシ塩化リン9mlに懸
濁し、DMF1.2mlを加え100℃で1時間かき混ぜ
た。反応物を200mlの氷水にあげ、30分かき混ぜた
のち酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を重曹水、食
塩水の順に洗浄し乾燥(MgSO₄)後、減圧下に濃縮し
た。残留部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展
開溶媒:n-ヘキサン/酢酸エチル6:1)に付し2-クロ
ロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-
(4-ニトロフェニル)ピリジンの0.95gを無色粘稠油
状物として得た。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.35 (3H, t, J=7.0H
z), 1.43 (3H, t, J=7.0Hz), 4.42 (2H, q, J
=7.0Hz), 4.49 (2H, q, J=7.0Hz), 7.78
(2H, d, J=9.0Hz), 8.35 (2H, d, J=9.0Hz).
IR(neat) ν: 2980, 1740, 1580, 1550,
1530, 1350, 1300, 1260, 1230, 11
30, 1095, 1015, 860, 830, 735, 700
cm⁻¹.

【0156】 参考例72

3-アミノ-6-クロロ-4, 5-ジエトキシカルボニ
ル-2-(4-アミノフェニル)ピリジン

2-クロロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニト
ロ-6-(4-ニトロフェニル)ピリジン0.91gおよび
還元鉄1.11gをエタノール20mlに懸濁し60℃に加
温、濃塩酸4.7mlを加えたのち20分間加熱還流し
た。反応液を濃縮後酢酸エチルで抽出、重曹水、食塩水
の順に洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮後、残
留部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:
クロロホルム/メタノール40:1)に付し3-アミノ-
6-クロロ-4, 5-ジエトキシカルボニル-2-(4-
アミノフェニル)ピリジンの0.58gを黄色プリズム晶
として得た。

mp 137℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (3H,
t, J=7.0Hz), 1.42 (3H, t, J=7.0Hz), 3.8
4 (2H, br. s), 4.36 (2H, q, J=7.0Hz), 4.42
(2H, q, J=7.0Hz), 5.95 (2H, s), 6.77 (2
H, d, J=8.5Hz), 7.44 (2H, d, J=8.5Hz). IR
(KBr) ν: 1735, 1700, 1610, 1520, 1
405, 1305, 1235, 1180, 1105, 106

5, 1025, 835 cm^{-1} .

【0157】実施例22

8-アミノ-5-クロロ-7-(4-アミノフェニル)ピリド[3, 4-d]ピリダジン-1, 4(2H, 3H)ジオン(L-043)

3-アミノ-6-クロロ-4, 5-ジエトキシカルボニル-2-(4-アミノフェニル)ピリジン0.30gにヒドラジン-水と物6mlを加え、90℃で30分間加熱した。反応液を氷水(150ml)にあげ、酢酸でpH6に調整し、析出沈澱物を濾取水洗した。これをDMSO-H₂Oから再沈澱し8-アミノ-5-クロロ-7-(4-アミノフェニル)ピリド[3, 4-d]ピリジン-1, 4(2H, 3H)ジオンの0.21gを橙色粉末として得た。

mp 300℃以上。NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 5.53(2H, br. s), 6.68(2H, d, J=8.5 Hz), 7.29(2H, br. s), 7.44(2H, d, J=8.5 Hz), 11.30-11.90(2H, br.). IR(KBr) ν : 1625, 1605, 1580, 1400, 1290, 1180, 1120, 1070, 870, 835 cm^{-1} . 元素分析: 計算値(C₁₃H₁₀N₅O₂Cl \cdot 1/4H₂O) C: 50.66; H: 3.43; N: 22.72. 測定値 C: 50.70; H: 3.51; N: 22.85.

【0158】参考例73

3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニル-2-スルホピリジン

2-クロロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.70g、エタノール7mlの溶液に、亜硫酸ナトリウム0.28g/水7ml溶液を加え、20分間加熱還流した。反応液を濃縮後、1N HClで酸性とし酢酸エチルで抽出、食塩水で洗浄、乾燥(MgSO₄)した。減圧下に濃縮乾固し、残渣をクロロホルム/エーテルから再結して、0.47gの白色結晶を得た。mp 187-190℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.16(3H, t, J=7.0 Hz), 1.27(3H, t, J=7.0 Hz), 4.25(2H, q, J=7.0 Hz), 4.32(2H, q, J=7.0 Hz), 7.23(3H, br. s), 7.35(2H, br. s).

【0159】参考例74

3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-スルホピリジン

3, 4-ジエトキシカルボニル-3-ニトロ-2-フェニル-6-sulfoピリジン0.34g、還元鉄0.41g、エタノール7mlの混合物を60℃に加熱し、濃塩酸0.5mlを加えたのち20分間加熱還流した。反応液を濃縮乾固後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム/メタノール5:1)に付し0.24gの淡黄色粉末を得た。

mp 220℃(dec). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 1.26(6H, t, J=7.0 Hz), 4.16(2H, q, J=7.0 Hz), 5.94(2H, s), 7.45-7.60(5H, m). IR

(KBr) ν : 1720, 1600, 1420, 1385, 1320, 1250, 1200, 1085, 1045, 665, 605 cm^{-1} .

【0160】実施例23

8-アミノ-5-スルホ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジン-1, 4(2H, 3H)ジオン(L-044)

3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-2-フェニル-6-スルホピリジン0.184gにヒドラジン-水と物9mlを加え、90℃で30分間反応させた。反応液を減圧下に濃縮後、エタノールを加え析出する沈澱物を濾取、これをSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー(展開溶媒: 水)に付し、目的画分を凍結乾燥して0.059gの黄色粉末を得た。

mp 175-180℃(dc.). NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 2.80-5.20(ca. 10H, br.), 7.40-7.60(3H, m), 7.65-7.75(2H, m). IR(KBr) ν : 1650, 1585, 1325, 1225, 1170, 1075, 1030, 635, 580 cm^{-1} .

【0161】参考例75

3, 4-ジエトキシカルボニル-2-メルカプト-5-ニトロ-6-フェニルピリジン

2-クロロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.27gをメタノール10mlに溶解し、水流化ナトリウムn-水和物0.147gを加え室温で30分間掻き混ぜた。反応液を濃縮乾固し、1N HClで酸性としたのち酢酸エチルで抽出、有機層を食塩水で洗浄した。硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮乾固すると0.31gの橙色結晶が得られた。

mp 129-132℃. NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.36(3H, t, J=7.0 Hz), 1.41(3H, t, J=7.0 Hz), 4.39(2H, q, J=7.0 Hz), 4.44(2H, q, J=7.0 Hz), 7.40-7.60(5H, m). IR(KBr) ν : 1740, 1570, 1525, 1345, 1270, 1235, 1215, 1125, 1020, 705 cm^{-1} .

【0162】参考例76

3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-6-メルカプト-2-フェニルピリジン

3, 4-ジエトキシカルボニル-2-メルカプト-5-ニトロ-6-フェニルピリジン0.30g、還元鉄0.41g、エタノール7mlの混合物を60℃に加熱し、ついで濃塩酸1.7mlを加えた後30分間加熱還流した。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出し食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しクロロホルムで展開すると0.21gの黄橙色粘稠油状物が得られた。

NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.33(3H, t, J=7.0 Hz), 1.34(3H, t, J=7.0 Hz), 4.31(2H, q, J=7.0 Hz), 4.32(2H, q, J=7.0 Hz), 5.84(2H, s), 7.35-7.40(3H, m), 7.40-7.50(2H, m). IR(KBr) ν : 1725, 1590, 1405,

1305, 1235, 1110, 1070, 1030, 710 cm^{-1} .

【0163】実施例24

8-アミノ-5-メルカプト-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオン(L-045)

3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-6-メルカプト-2-フェニルピリジン0.21gにヒドラジーン水和物6mlを加え、90℃で15分間加熱した。反応液を氷水にあげ酢酸酸性とし、析出沈澱物を濾取して褐色粉末53mgを得た。濾液をSephadex(登録商標)LH-20カラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出するとさらに褐色粉末の34mgが得られた。両者を合わせシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/メタノール5:1)に付し8-アミノ-5-メルカプト-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオンの47mgを得た。

mp 245-248℃(dec.). NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 4.90 (2H, br. s), 5.77 (1H, s), 7.55-7.60 (3H, m), 7.60-7.70 (2H, m). IR(KBr) ν : 1705, 1620, 1580, 1520, 1415, 1260 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) C: 52.87; H: 3.75; N: 18.97. 測定値C: 52.96; H: 3.25; N: 18.43.

【0164】参考例7

3, 4-ジメトキシカルボニル-2-メトキシ-6-メチル-5-ニトロピリジン

参考例34で得られた2-クロロ-3, 4-ジエトキシカルボニル-6-メチル-5-ニトロピリジン0.5gをメタノール5mlに溶かし、28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液0.37ml(1.2eq.)を加え、室温で1.5時間攪拌した。溶媒を留去し、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後乾燥、溶媒を留去し、結晶を得た。

収量 0.36g(79.7%). NMR(CDCl_3) δ (ppm): 2.66 (3H, s), 3.90 (6H, s), 4.07 (3H, s).

【0165】参考例78

3-アミノ-4, 5-ジメトキシカルボニル-6-メトキシ-2-メチルピリジン

3, 4-ジメトキシカルボニル-2-メトキシ-6-メチル-5-ニトロピリジン350mgを酢酸エチル5mlに溶かし、10% Pd-C(50% wet) 300mgを加え、4.5時間接触還元した。硫酸マグネシウムを用いて乾燥後、ろ過し溶媒を留去し油状生成物を得た。

収量: 280mg(89.4%). NMR(CDCl_3) δ (ppm): 2.40 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.90 (3H, s), 4.93 (2H, br.).

【0166】実施例25

8-アミノ-5-メトキシ-7-メチルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオン(L-18)

3-アミノ-4, 5-ジメトキシカルボニル-6-メトキシ-2-メチルピリジン(18:R=CH₃, R'=CH₃O) 280mgをメタノール8mlに溶かし、ヒドラジーン水和物0.54ml(10eq.)を加え3時間還流した。析出した結晶をろ取し、メタノールで洗浄した。結晶を水に懸濁し、塩酸酸性として、ろ取し、水洗した。

収量: 46mg(18.8%). mp 285-287℃(dec.). NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 2.37 (3H, s), 3.87 (3H, s), 6.59 (2H, br.). IR(KBr) ν : 3460, 3340, 1650, 1630 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$) C: 48.65; H: 4.54; N: 25.21. 測定値C: 48.70; H: 4.53; N: 24.95.

【0167】実施例26

8-アミノ-5-ヒドロキシ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオン(L-7) 参考例29で得られた3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-6-ヒドロキシ-2-フェニルピリジン50mgにヒドラジーン水和物1mlを加え100℃、1時間、窒素気流下加熱した。氷冷下、反応液に水を加え、塩酸で中和、pH5とし、生じた黄色粉末状結晶をろ取した。

収量: 37mg(90.5%). mp 300℃以上. NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 5.97 (2H, br.), 7.53 (5H, m). IR(KBr) ν : 3480, 3350, 2970-2900, 1670, 1640, 1575, 1565, 1255, 800 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 0.4\text{H}_2\text{O}$) C: 56.28; H: 3.78; N: 20.19. 測定値: C, 56.43; H, 3.58; N, 20.33.

【0168】実施例27

8-アミノ-5-ジメチルアミノ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオン(L-19)

参考例31で得られた3-アミノ-4, 5-ジエトキシカルボニル-6-ジメチルアミノ-2-フェニルピリジン250mgに、ヒドラジーン水和物5mlを加え、100-110℃で1.5時間加熱した。溶媒を留去し、水を加え、pH3とし、ろ取した。1N水酸化ナトリウムを用いてナトリウム塩とし、ろ取した。

収量: 106mg(47.5%). mp 300℃以上. NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 2.79 (6H, s), 7.03 (2H, br.), 7.42 (3H, m), 7.84 (2H, d, J=8.4Hz). IR(KBr) ν : 3030, 1655, 1585 cm^{-1} . 元素分析: 計算値($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}$) C: 56.43; H: 4.42; N: 21.93. 測定値C, 56.25; H, 4.49; N, 21.72.

【0169】実施例28

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジーン-1, 4 (2H, 3H) ジオン ナトリウム塩(L-012 ナトリウム塩)

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3, 4-

d)ピリダジン-1, 4 (2H, 3H)ジオン(L-012)の1.50gを、1N水酸化ナトリウム水溶液の50mlにかきまぜながら加えた。一旦溶解したのち析出する淡黄色結晶を濾取し、少量の1N水酸化ナトリウム水溶液、ついでエタノールで洗浄、乾燥すると1.48gの目的化合物が得られた。

mp >300°C

NMR(DMSO-d₆) δ (ppm): 7.35~7.55 (3H, m), 7.65~7.70 (2H, m), 7.40~8.20 (2H, br.), 10.5 (1H, br. s).

IR(KBr) ν: 1650, 1550, 1455, 870 cm⁻¹.

元素分析: 計算値(C₁₃H₈N₄O₂ClNa : C: 50.26; H: 2.60; N: 18.03. 測定値: C: 49.91; H: 2.35; N: 17.63.

【0170】実施例29

化学発光検出法を用いるサンドイッチ酵素免疫測定法(II)

EIA用イムノプレートを用いてヒト血清中bFGFの測定を行った。

1. 抗体感作プレートの調製

MAb52とMAb98の等量混合物を0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)にて50μg/mlとなるように希釈し、EIA用イムノプレート(Micro Fluor "W"プレート; ダイナテック社製)の各ウェルに100μlずつ注入して4°Cで一夜放置して感作させた。0.15M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)にて洗浄した後、25%ブロックエース(大日本製薬)および0.15M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)を各ウェルに注入して用時まで冷所保存した。

【0171】2. ヒト血清中bFGFの測定

(a)試薬

(1)実施例9で得られた酵素標識抗体(3H3-HRP)

(2)1で得た抗体感作マイクロプレート

(3)リコンビナントヒトbFGF(rhbFGF)

(4)緩衝液A(0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)、緩衝液B(25%ブロックエース(大日本製薬)、0.15M NaCl、100μg/mlヘパリンを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)、緩衝液C(10μg/mlマウスIgGを含む緩衝液B)

(5)発光用L-012溶液(100μM L-012, 50μM 4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール、25μM EDTA、5%DMSOを含むpH7.5のトリス塩酸緩衝液)

(6)bFGFゼロ血清(ヒトプール血清をMAb98を固定化したアフィニティカラムにかけ、bFGFを除い

たもの)

(7)不活化HRP(HRPを121°C、30分間オートクレーブ処理したもの)

【0172】(b)測定

ゼロ血清または被検血清80μl、標準rhbFGF含有緩衝液Bまたは緩衝液Bのみ80μl、30μg/mlマウスIgG、1.5M NaCl、60μg/ml不活化HRP含有緩衝液B80μlを混合して調製したサンプルの100μlを(1)で得られた抗体感作プレートの各ウェルに注入し、4°C、24時間反応させた。各ウェルを緩衝液Aで洗浄後、緩衝液Cで300倍に希釈した酵素標識抗体溶液100μlを加えて4°Cでさらに4時間反応させた。各ウェルを緩衝液Aで洗浄し、発光用L-012溶液50μl、続いて600μM過酸化水素溶液50μlを添加し、化学発光反応を生ぜしめた。ルミネッセンスリーダー(ML-1000, ダイナテック社製)を用いて各ウェルの発光量を測定した。標準曲線を第3図に示す。この方法により血清中hbFGFが約2pg/mlまで測定できる。またL-012のナトリウム塩を発光基質として用いた場合も、L-012と同様の感度で血清中hbFGFの測定が可能であった。

(c)正常人における血清中hbFGF量

健康人(n=25)における血清中hbFGF量を本測定法により測定した結果を第4図に示す。この結果、健康人のhbFGF量は平均5.9pg/mlであった。

(d)各種がん患者血清の測定

本測定法を用いて各種がん患者血清中のhbFGF量を測定した。結果を第4図に示す。カットオフ値を健康者平均+標準偏差×3(22pg/ml)とすると、陽性率は肺がん79.2%、腎がん67.7%、肝がん8.7%、胃がん0%であり、肺がん及び腎がん極めて高い陽性率を示した。

【図面の簡単な説明】

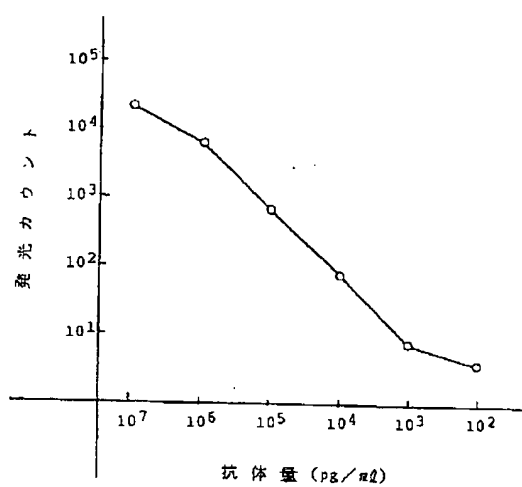
【図1】 実施例2の化合物(L-011)で標識された抗インタフェロンγ抗体量と発光カウントの関係を示すグラフである。

【図2】 ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子のサンドイッチ酵素免疫測定機において検出に実施例3(L-012)の化合物を用いて化学発光させた実験における標準曲線である。

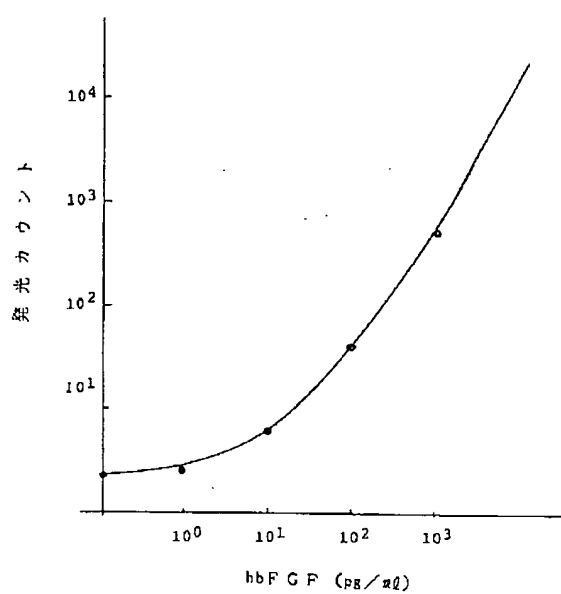
【図3】 標準rhbFGFを用いて作成された標準曲線を示す。

【図4】 正常人及び各種がん患者血清における測定結果を示す。図中の各レーンにおける横線はそれぞれの平均値を示す。

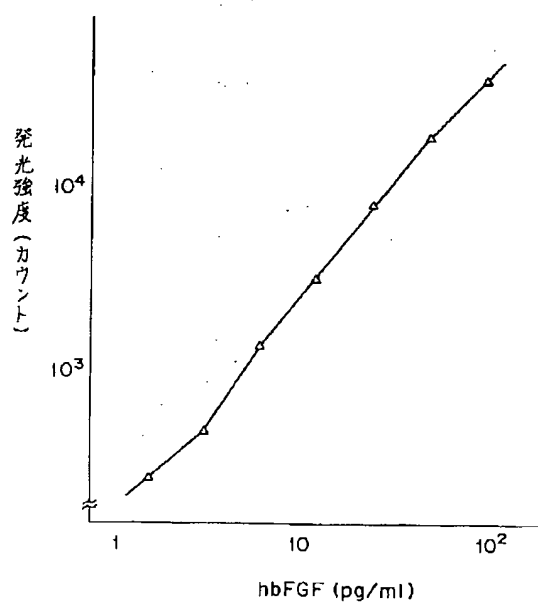
【図1】



【図2】

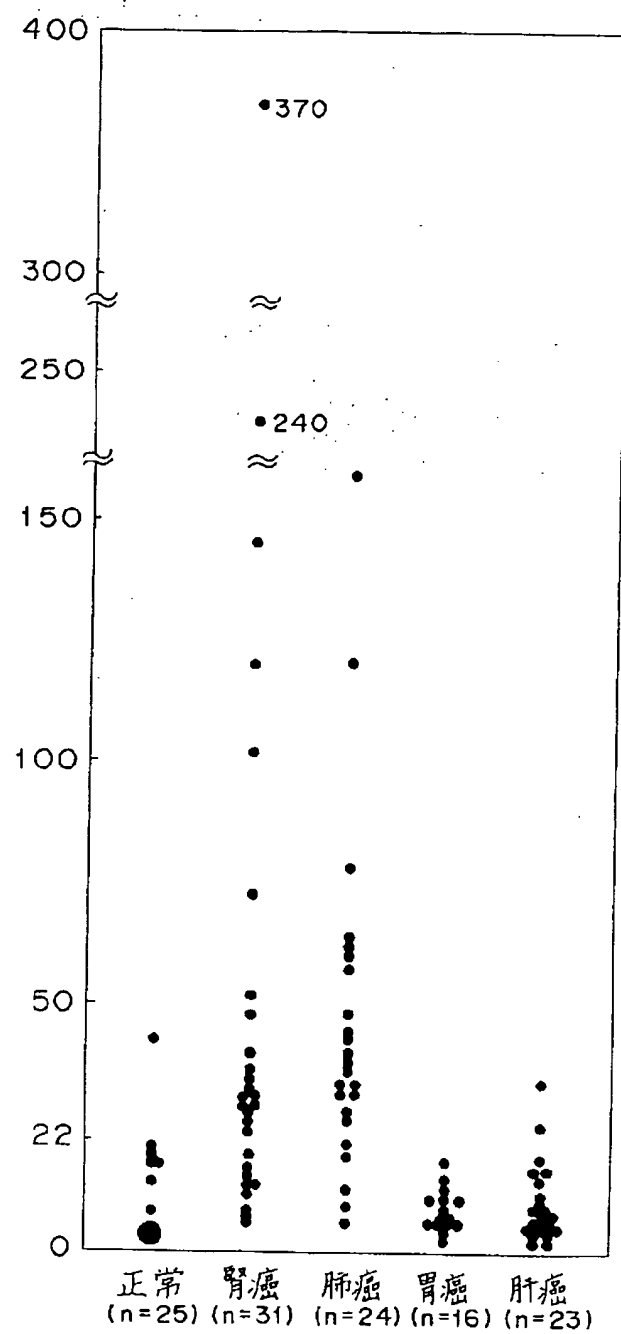


【図3】



【図4】

hbFGF (pg/ml)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.